

中國生理科學會
生物化學營養學學術討論會

生物化學研究論文

(摘要)

1962年11月

20-22
108

108

58.173
178

目 錄

| | | |
|--|--|-----|
| (1) 測定血清清蛋白和球蛋白的新方法..... | 陳同度 王淑春 | 3 |
| (2) 雞蛋清蛋白加熱變性時的水解作用..... | 陳同度 周翊鐘 | 3 |
| (3) 超聲波對牛血清清蛋白某些理化性質及抗原性的影響..... | 梁植權 王琳芳 潘華珍 王來岷 | 17 |
| (4) 以硫酸右旋糖酐大量分離人血清β脂蛋白的研究..... | 王克勤 陳玉芳 冉碧芳 | 54 |
| (5) 血清蛋白澱粉膠電泳方法研究..... | 王兆裕 | 57 |
| (6) 肽的研究 I. 帶保護基的胰島素 A 鏈氨基端五肽的合成..... | 汪猷 徐杰誠 陸仁榮 黃剛 黃敬堅 | 77 |
| (7) 肽的研究 II. 帶保護基的胰島素 A 鏈羧基端九肽的合成..... | 汪猷 黃敬堅 張偉君 屠傳忠 王志勤 徐元耀 湯永禔 陸蘊華 金善煒 龔嶽亭 | 78 |
| (8) 肽的研究 III. 牛胰島素 A 鏈中段帶保護基團的七肽 (N-苄氧羰基-S-苄基-L-半胱氨酸-S-苄基-L-半胱氨酸-L-丙氨酸-L-絲氨酸-L-纈氨酸-S-苄基-L-半胱氨酸-L-絲氨酸) 的合成..... | 汪猷 陸熙炎 徐杰誠 張偉君 陳毓羣 蔡祖暉 韓廣甸 吳照華 徐錦文 余微明 仲同生 | 79 |
| (9) 胰島素 B 鏈中肽段的合成 V. 胰島素 B 鏈 C-端十肽衍生物的合成及其降解的研究..... | 龔嶽亭 葛麟俊 鈕經義 | 80 |
| (10) 胰島素 S-磺酸型 B 鏈的直線聚合作用..... | 魯子賢 彭加木 張友尚 曹天欽 | 81 |
| (11) 蓖麻種籽蛋白的滴定曲線..... | 徐永華 孫崇榮 | 86 |
| (12) 應用澱粉凝膠電泳法測定我國(上海)人的 Hp 型..... | 夏其昌 邱萬榮 方深高 | 87 |
| (13) 原肌球蛋白晶體的電子顯微觀察..... | 曹天欽 龔祖墳 鄒永水 張友尚 彭加木 | 88 |
| (14) 兔原肌球蛋白中的半胱氨酸..... | 任梅軒 徐俊傑 龔祖墳 曹天欽 | 90 |
| (15) 海洋動物肌肉結構蛋白的研究 I. 軟骨魚係原肌球蛋白的一些特性..... | 潘家秀 王桂元 曹蕙婷 曹天欽 | 91 |
| (16) 在過量巰基化合物存在時蛋白質巰基的測定..... | 杜雨蒼 鄒承魯 | 106 |
| (17) 生物高分子中激子和空穴的轉移..... | 張華 | 9 |
| (18) 蛋白質分子的電子結構與催化作用..... | 張華 | 8 |
| (19) 血清對巰基化合物氧化速度的影響..... | 吳蔚 吳祖澤 | 16 |
| (20) 嘧啶核糖核苷酸的比色測定..... | 夏壽萱 施秉儀 | 15 |
| (21) 磷酸鈣柱層析在動物組織 RNA 的分離及穩定性研究方面的應用..... | 劉士廉 林沁瑛 肖梓仁 劉培楠 | 21 |
| (22) 超聲波輻射對大分子核糖核酸的影響..... | 蔡良琬 陳煜清 張福徽 梁植權 | 23 |
| (23) 核酸鹼基組成分析方法的 III. 脫氧核糖核酸嘔吟和嘧啶衍生物直接分光光度測定法..... | 胡炳晟 劉承斌 吳翬 梁植權 | 24 |
| (24) 大腸桿菌可溶性核糖核酸的提取及其性質的研究..... | 吳冠芸 胡炳晟 楊秋霜 劉樹忠 張福徽 陳煜清 劉承斌 魏文玲 陳海深 梁植權 | 56 |

5316167

中科院植物所图书馆
S0014706

- (25) 核酸類化合物對 C^{14} -甘氨酸參入到大腸桿菌原生質體製劑中的影響.....
.....董霖 孟威廉 100
- (26) 可溶性核糖核酸的酶促降解 I. 大腸桿菌核糖核酸酶對大腸桿菌可溶性核
糖核酸的作用.....劉望夷 王德寶 130
- (27) 家蠶及蓖麻蠶絲腺體核糖核酸的結構分析.....劉新垣 王德寶 134
- (28) 2-脲尿酸對大腸桿菌中硝酸還原酶誘導形成的影響.....
.....沈思祥 沈寅初 沈仁權 135
- (29) 大白鼠尿中脫氧核糖核酸酶 (DNase) 的研究.....孟清孟 張成端 140
- (30) 肽的酶激活作用.....崔桂芳 于富才 王德寶 151
- (31) 金屬離子與核酸的相互作用 I. 鋅離子與核酸結合的光譜研究 II. 鋅離
子對核酸的沉澱作用.....李載平 呂新法 152
- (32) 金屬離子與核酸的相互作用 III. 銅離子與核酸結合作用的研究.....景沛 155
- (33) 蛋白二硫還原酶的提純和性質的初步研究.....李士諤 趙德臻 朱式玉 18
- (34) 酰化作用對木瓜蛋白酶活性的影響.....陳同度 周德明 4
- (35) 廣西地區蛇毒生化研究 I. 三種蛇毒三種酶活性的初步觀察.....
.....魏琦 梁熙南 王松江 黎秀芳 67
- (36) 綠豆種子蛋白酶的研究.....朱德煦 蔡幼民 76
- (37) 木瓜蛋白酶的研究 IV. 活性中心組氨酸殘基的羧甲基化.....孫玉琨 鄒承魯 83
- (38) 琥珀酸脫氫酶異咯嗪輔基與酶氈的連接.....
.....戚德芳 王應暉 鄒承魯 方宇忠 俞家華 84
- (39) 綠豆中兩種胰蛋白酶抑制劑的提取、結晶與活力測定.....屈賢銘 戚正武 101
- (40) 豬羊胰臟中若干蛋白水解酶的提取、結晶與鑑定.....戚正武 吳克佐 許實榮 102
- (41) 蛋白質功能基團的改變與其生物活力的關係 II. 胰蛋白酶的硫硫鍵與其
活力的關係.....許根俊 鄒承魯 104
- (42) 蛋白質功能基團的改變與生物活力的關係 III. *P*-硝基-*W*-溴代苯乙酮
對某些蛋白質活力的影響.....鄒承魯 孫玉琨 許根俊 杜雨蒼 105
- (43) 醛縮酶的活性中心.....伍欽榮 時婉勤 107
- (44) 牛脾酶劑催化白氨酸胺聚合作用的初步研究.....孫玉琨 黃祥英 107
- (45) 抑制劑影響生成酶酰化物為中間物系統的動力學.....許根俊 鄒承魯 108
- (46) 家蠶和野蠶的轉氨酶及酰胺酶的比較研究以及蓖麻蠶絲腺體支鏈氨基酸-谷
氨酸轉氨酶和天門冬酰胺酶的提取及其性質.....許延森 劉靜如 唐梓進 39
- (47) 光合磷酸化的研究 VI. 2,6-二氯酚吡嗪酚光還原過程中有偶聯的磷酸化
.....沈羣懋 楊善元 沈允綱 147
- (48) 氧化磷酸化作用解偶聯劑2,4-二硝基苯酚對綫粒體中琥珀酸氧化的激活和
抑制.....林其誰 伍欽榮 121
- (49) 肝綫粒體琥珀酸氧化機制的研究.....敖世洲 張友端 122
- (50) 生物化學反饋反應的研究 一、動力學的特性.....徐京華 郁賢章 149
- (51) 飢餓大白鼠肝腦的谷氨酸代謝.....李芳生 徐洵 58
- (52) 初生大白鼠及成鼠肝腦中谷氨酸氧化酶系的對比研究.....李芳生 徐洵 60

- (53) 偶氮染料對大鼠肝色氨酸吡咯酶底物誘導的影響及其機制的研究.....
.....李士諤 譚潤生 賈錫安 71
- (54) 氯仿中毒對大鼠肝臟酪氨酸氧化酶系的影響.....王忠炎 129
- (55) 缺氧狀態下小鼠及大鼠腦中氨基移換酶及乳酸的一些變化.....
.....王鏡岩 劉展環 包永德 6
- (56) 大白鼠在組織缺氧狀態下大腦皮層不同層內乳酸的積累過程.....王鏡岩 5
- (57) 生活在低溫下大鼠肌肉綫粒體氧化磷酸化的研究.....
.....于樹玉 沈瑯琪 姜明軒 王世旗 李士諤 53
- (58) 谷氨酸醱酵菌——2990-6 號的代謝 一、葡萄糖的降解途徑.....
.....佘微明 楊常仁 周光宇 124
- (59) 谷氨酸醱酵菌——2990-6 號的代謝 二、三羧循環.....龔蓁蓁 周光宇 125
- (60) 谷氨酸醱酵菌——2990-6 號的代謝 三、天門冬氨酸酶與谷氨酸醱酵.....
.....陳立羣 周光宇 126
- (61) 谷氨酸醱酵菌——2990-6 號的代謝 四、還原型菸酰胺核苷酸的氧化.....
.....曾以申 周光宇 127
- (62) 2990-6號菌的己糖激酶.....楊建中 周光宇 128
- (63) 白地霉的戊糖代謝 2. 木糖與葡萄糖培養菌株糖代謝的比較.....
.....楊康婉 方一澄 張樹政 52
- (64) 白地霉細胞中甘露醇的鑑定及其形成機制的研究.....張樹政 黎膏翔 10
- (65) 白地黴 (*Geotrichum Candidum*) 對各種碳源的氧化作用.....
.....簡浩然 丁達明 曾雲添 卓中其 74
- (66) 病毒侵染與寄主植物代謝關係的初步研究.....湯佩松 田波 72
- (67) 蓖麻蠶核型多角體病毒的研究 I. 形態及其他性質的觀察 II. 包含體酸
鹼溶化曲綫.....匡達人 連秉鈞 王應魁 金心梅 劉蓮英 92
- (68) 幾個烟草花葉病毒毒株的化學和物理化學的比較研究.....
.....張友尙 裴美雲 曹天欽 周家熾 93
- (69) 氫化可的松的微生物氧化.....張麗青 97
- (70) 細菌 A-3 對幾種烴類化合物的氧化性能.....王大琛 汪猷 94
- (71) 石臘油的細菌氧化產物三種高級脂肪酸的初步研究.....
.....黃敬堅 王大琛 周樂 汪猷 95
- (72) β -二羧二醌對胺類的催化氧化的初步報告.....
.....汪猷 黃敬堅 楊淵珠 陳增壽 王大琛 98
- (73) 人工肝臟功能障礙動物的精氨酸負荷試驗的研究...單鴻仁 康效岩 史愛芬 12
- (74) 關於血中惡性磷脂作為癌腫早期診斷的評價.....
.....林文光 劉友堯 吳瑞榮 李光展 13
- (75) 老范志神麩生化學的研究報告 I. 糖化力的研究.....林公際 林文光 14
- (76) 艾氏腹水癌小白鼠蛋白質和核酸含量的研究.....方丁 19
- (77) 克山病的臨床酶學考察 (一) 血清銅氧化酶 (Ceruloplasmin).....
.....劉瑞玲 楊同書 朱育惠 27

| | | |
|---|-------------------------|-----|
| (78) 克山病的臨床酶學考察 (二) 血清谷草轉氨酶 (S. GOT)..... | 趙嵐勤 楊同書 朱育惠 | 28 |
| (79) 克山病的臨床酶學考察 (三) 血清醛縮酶 (S. Ald)..... | 毛運宜 楊同書 朱育惠 | 29 |
| (80) 克山病的臨床酶學考察 (四) 血液碳酸酐酶..... | 張行海 楊同書 朱育惠 | 30 |
| (81) 克山病的臨床酶學考察 (五) 克山病的血液酶譜 (Enzymogram)..... | 楊同書 朱育惠 | 31 |
| (82) 克山病的臨床酶學考察 (六) 血液酶譜變動的機制..... | 楊同書 朱育惠 | 32 |
| (83) 關於營養性水腫病患者的臨床生化研究..... | 任邦哲 蘆義欽 朱定爾 奉騰蛟 吳若鈺 文震西 | 33 |
| (84) 抗腫瘤藥對核酸代謝的影響 I. <i>N</i> -甲酰溶肉瘤素、谷氨酰溶肉瘤素對動物移植性腫瘤及正常組織中核酸的含量的影響..... | 王振綱 籍秀娟 韓銳 范禮理 | 35 |
| (85) 抗腫瘤藥對核酸代謝的影響 II. <i>N</i> -甲酰溶肉瘤素、谷氨酰溶肉瘤素對 P^{32} 參入動物移植性腫瘤及正常組織核酸的影響..... | 籍秀娟 王振綱 韓銳 | 35 |
| (86) 食管癌病人血尿若干生化值的分析..... | 苗健 陳本懋 關力 油書恆 邱蘇吾 楊雲虹 | 36 |
| (87) 針刺足三里對尿中 17-羥皮質類固醇含量的影響..... | 萬駝先 張德琇 蔣滢 | 43 |
| (88) 癌腫病人的末梢血過氧化氫酶..... | 李英 沈奇桂 | 44 |
| (89) 抗日本住血吸蟲新藥 F-30066 的生化研究 I. F-30066 與谷胱甘肽及蛋白質巯基的作用..... | 邵靖宇 林茂芳 湯海祥 | 46 |
| (90) 抗日本住血吸蟲新藥 F-30066 的生化研究 II. E-30066 對糖酵解的影響..... | 邵靖宇 林茂芳 | 47 |
| (91) 抗日本住血吸蟲新藥 F-30066 的生化研究 III. F-30066 對尿素合成的影響..... | 李英 儲範 湯海祥 | 49 |
| (92) 抗日本住血吸蟲新藥 F-30066 的生化研究 IV. F-30066 對肝勻漿氧化磷酸化作用的影響..... | 李英 劉子貽 王水珍 | 50 |
| (93) 抗腫瘤藥物的研究 IV. 抗腫瘤藥對瘤細胞呼吸及酵解的影響..... | 韓銳 雷海鵬 | 61 |
| (94) 正常人血清脂蛋白及其分子中膽固醇和磷脂的含量與比值..... | 楊可瑩 王金榮 高玉印 袁必遂 魏春軒 | 63 |
| (95) 我國正常人血清膽碱酯酶活力的測定..... | 李增烈 | 64 |
| (96) 高血壓患者及經氣功藥物綜合治療前後血清脂蛋白及胆碱酯酶活力的觀察..... | 楊可瑩 袁必遂 魏春軒 王金榮 | 65 |
| (97) 皮質醇對肝臟中谷-丙轉氨基酶作用的研究..... | 李韻笙 朱伯明 陳明璧 | 68 |
| (98) 利用放射性 32 磷研究以皮質素誘導大鼠肝色氨酸吡咯酶時肝中酸溶性磷酸化合物變化的初步報導..... | 吳文俊 指導人: 張惠珠 | 110 |
| (99) 大白鼠注射皮質素後肝糖元異生作用和組織谷丙轉氨基酶活力的關係..... | 潘碧霞 指導人: 張惠珠 | 113 |

- (100) 應用 S^{35} -甲硫氨酸探討晚期血吸蟲病低清蛋白血症的形成機制.....
.....何開玲 呂懿娟 邵光第 李 亮 115
- (101) 腹水癌粒綫體有氧情況下對酵解的抑制作用.....李文裕 錢若蘭 胡兆慶 117
- (102) 關係腫瘤“惡性磷脂”的探討.....胡兆慶 李文裕 119
- (103) 艾氏腹水腫瘤細胞綫粒體能量利用的局部化.....杜錦珠 李 瀟 伍欽榮 120
- (104) 肝癌病人尿液中特殊紫外光吸收物質的研究.....王昌材 孫 冊 132
- (105) 腎虛病人尿中 17-羥類固醇排洩量改變的觀察.....
.....顧天爵 張麗麗 沈自尹 李 亮 141
- (106) 腎虛病人的能量代謝研究 I. 腎虛病人之基礎代謝與紅血球中糖的分解代
謝...何開玲 李 亮 黃華樓 沈自尹 肖能慮 姜惠馨 林茂芳 高益芝 144
- (107) 腎虛病人的能量代謝研究 II. 促腎上腺皮質激素對紅血球糖代謝影響.....
.....何開玲 李 亮 張麗麗 陳惠黎 146
- (108) 脫氧核糖核蛋白中脫氧核糖核酸輻射損傷的劑量曲綫.....吳 蔚 吳祖澤 1
- (109) Co^{60} γ 綫致死劑量照射對豚鼠、大鼠、脾肝戊糖代謝的影響...黃如衡 王培仁 2
- (110) 降低體溫和 X 綫照射對大白鼠肝、脾和十二指腸磷濃度和磷更新率的影響
.....胡美浩 王素雲 李芬芬 高天禮 李建武 7
- (111) X 射綫對小家鼠雄性生殖細胞作用的電子顯微鏡與組織化學觀察.....霍中和 7
- (112) 電離輻射對大鼠肝 nRNA 代謝的影響 I. Co^{60} 外照射對大鼠肝 nRNA
含量的影響.....楊澤田 李恆澤 王成沛 萬芷芳 陳蘇民 蘇成芝 25
- (113) 酵母菌過氧化氫酶含量與其輻射損傷的關係.....金元禎 鄒承魯 42
- (114) X-射綫對小牛胸腺 DNA 的隱藏破壞作用 II. 射綫導致的氫鍵不穩定性
.....李載平 錢肖貞 景 沛 137
- (115) 整體 X-射綫照射對大白鼠胸腺核蛋白(DNP)的影響.....張永蓮 張友端 138

脫氧核糖核蛋白中脫氧核糖核酸

輻射損傷的劑量曲綫

吳 蔚 吳祖澤

(中國人民解放軍後字 231 部隊,北京)

作者在“脫氧核糖核蛋白中脫氧核糖核酸的輻射敏感性”論文中,觀察到在 5000 倫琴 γ 射綫的照射下,小白鼠胸腺 DNP 中 DNA 的輻射損傷較同樣條件下單獨照射的 DNA 爲敏感。本文進一步研究了上述損傷效應的劑量依賴關係,預防藥物的保護作用,探討了可能的損傷機制。

小白鼠胸腺 1 M NaCl 水溶液,分別經 0, 500, 1,000, 2,500, 5,000 和 7,500 倫琴不等劑量的 γ 射綫照射後,按硫酸+二酯鈉及氯仿方法提取其中 DNA。在含有 0.014 M 檸檬酸鈉的 0.14 M NaCl 水溶液中,測定其物化性質 (DNA 的 N/P 在 1.60—1.70 間)。

從特性粘度與 T_m 的下降,顯示了 DNP 中 DNA 的輻射損傷隨照射劑的增加按不同速率而加大。在同樣條件下,分別照射由小白鼠胸腺提取 DNA 的 1 M NaCl 水溶液,粘度和 T_m 的下降比較平緩。以 $[\eta]$ 對照射劑量作圖呈綫性關係。

作者從預防藥物,例如谷胱甘肽,對 DNP 中 DNA 的輻射損傷具有保護作用,以及 DNP 輻射損傷的濃度效應中闡明了 DNP 中 DNA 的輻射損傷主要是通過間接作用造成的。由 DNP 中 DNA 的輻射損傷與單獨 DNA 輻射損傷的不同劑量曲綫形式,提出了 DNP 中 DNA 的輻射損傷是由二種不同類型的損傷機制組成的:

(1) 蛋白質的加強效應: 在 DNP 中 DNA 的輻射損傷曲綫的前一部分, T_m 與 $[\eta]$ 隨照射劑量的增加,急劇下降,斜率遠大於單獨 DNA 損傷的劑量曲綫,推測了 DNP 中蛋白質加強了 DNA 的輻射損傷,導致 DNA 分子內部和分子之間正常相互聯系的破壞,從而改變了 DNA 的分子結構及其相應的物化性質^[1]。

(2) DNA 的輻射降解: 在劑量較大時, T_m 與 $[\eta]$ 的下降較爲緩慢,趨於與單獨 DNA 輻射損傷的劑量曲綫相平行。推測了以電離輻射造成 DNP 中 DNA 的任意降解爲主^[2]。

主要參考文獻

- [1] Doty, P.: "Secondary Structure in Ribonucleic Acid", Proc. N. A. S. (U. S.) [1959], 45, No. 4, 482.
- [2] Peacocke, A. R.: "The Action of γ -rays on DNA in Solution", Proc Roy. Soc. B (London) [1958] 149, 511.

Co⁶⁰ γ 綫致死劑量照射對豚鼠、大鼠、 脾肝戊糖代謝的影響

黃如衡 王培仁

(中國人民解放軍後字 231 部隊,北京)

已知電離輻射會引起組織內,尤其是造血器官中核酸的嚴重下降,磷酸化活力也發生變化,作為核酸,核苷酸及輔酶等重要組成成分的戊糖,其代謝受射綫的影響,未見文獻報導,本文報告用豚鼠(250克)與大鼠(150克)經 Co⁶⁰ γ 綫 700 倫照射後,分 5 小時, 24 小時, 48 小時與 72 小時斷頭,取出組織(脾或肝)。稱重後在玻質勻漿器中配成 100 毫克/毫升水的勻漿,然後按上文報告方法,研究其戊糖代謝的變化,每次實驗用二只照射動物,一只正常動物。

表 1 為 700 倫照射後大鼠與豚鼠脾勻漿戊糖代謝的變化,從表中結果可見戊糖的分解,在照後 5 小時先增高,然後逐漸下降,而戊糖合成則無上升現象,如照射劑量減小為 400 倫也有類似的情況,但變化比較小,下降速度也慢。

表 1 700 倫照射後大鼠,豚鼠脾勻漿中戊糖代謝的影響

| 照射後 時間 (小時) | 大 鼠 | | 豚 鼠 | |
|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 戊 糖 分 解 | 戊 糖 合 成 | 戊 糖 分 解 | 戊 糖 合 成 |
| | 微克戊糖/100毫克組織/小時 | | | |
| 對 照 | 23.0 ± 6 (8)* | 57.36 ± 19 (8) | 32.8 ± 7.8 (7) | 23.8 ± 6.3 (7) |
| 5 | 32.1 ± 6 (4) | 34.0 ± 8.5 (4) | 47.3 ± 7.5 (4) | 13.2 ± 4.6 (4) |
| 24 | 28.6 ± 9.5 (4) | 26.0 ± 6.4 (4) | 41.2 ± 8.7 (4) | 9.5 ± 4.4 (4) |
| 48 | 17.0 ± 12 (4) | 17.7 ± 8.5 (4) | 25.2 ± 3.5 (4) | 10.7 ± 4.4 (4) |
| 72 | 19.6 ± 8.5 (4) | 36.2 ± 15 (4) | 31.02 ± 7.7 (4) | 6.96 ± 1.4 (4) |

* () 中數字為動物數。

另外豚鼠經 700 倫照射後,肝中戊糖代謝也有紊亂,戊糖的分解也是先升高後漸恢復,而戊糖的合成與脾不同也是先升(照後 5 小時) 24 小時下降,低於正常,但到 48 小時又恢復且反比正常為高,總的來說沒有脾那麼變化劇烈,組織不同對射綫的敏感性也不同其原因不明。

由於射綫對機體的破壞是很廣泛的,我們認為在正常狀況下機體中複雜酶系統,有其一定的排列次序,位置等,射綫破壞了這種秩序,也就擾亂了酶系之間正常的運轉,因此引起代謝的障礙,氧化磷酸化的下降即是明顯的例子,戊糖代謝的改變,更進一步說明射綫對機體損傷的原因之一“複酶系統”的破壞。

鷄蛋清蛋白加熱變性時的水解作用

陳同度 周翊鐘

(北京大學生物學系生物化學教研室)

吳憲等發現鷄蛋清蛋白在微酸或微鹼溶液中加熱變性時，釋放出對酚試劑呈陽性反應的非蛋白質物質。我們證實了吳憲等的這一發現，並進而研究了呈色物質的化學本質。

我們使四次重結晶的鷄蛋清蛋白在微鹼 (pH=9.6) 溶液中加熱變性。在中和沉澱變性蛋白質後所得的濾液中，用紙上層析法分析檢定生成的、對酚試劑呈陽性反應的非蛋白質物質的本質。研究結果證明，這些物質中含有五個多肽。它們都含有甘氨酸和絲氨酸。它們的其餘氨基酸組分為：

肽 I：天門冬氨酸、蘇氨酸、胱氨酸。

肽 II：天門冬氨酸、蘇氨酸、胱氨酸、賴氨酸。

肽 III：賴氨酸、谷氨酸、丙氨酸、纈氨酸。

肽 IV：蘇氨酸、賴氨酸、谷氨酸、酪氨酸、丙氨酸、纈氨酸、亮氨酸 (或異亮氨酸)。

肽 V：天門冬氨酸、賴氨酸、谷氨酸、酪氨酸、丙氨酸、纈氨酸、精氨酸、亮氨酸 (或異亮氨酸)。

肽 IV 和肽 V 都含有酪氨酸。它們可能就是吳憲等發現的、對酚試劑呈陽性反應的非蛋白質物質。

在吳憲氏提出他的變性學說以後，一般均認為變性作用破壞了蛋白質分子的付價鍵，因而改變了蛋白質分子的二級結構和三級結構。我們實驗證明，在微鹼溶液中鷄蛋清蛋白加熱變性時有水解作用。

測定血清清蛋白和球蛋白的新方法

陳同度 王淑春

(北京大學生物學系生物化學教研室)

測定人血清中的清蛋白和球蛋白含量在臨床診斷上有意義。

在微酸溶液中加熱，血清球蛋白變性，而血清清蛋白不變性。變性球蛋白可以在等電區域內沉澱析出。在微鹼溶液中加熱，血清球蛋白和清蛋白都變性。變性清蛋白在微酸或微鹼溶液中可以逆轉生成天然蛋白質，而血清球蛋白則不逆轉。血清球蛋白和清蛋白在變性作用上的這兩種差別均可作為分離測定這兩種蛋白質的依據。我們利用這兩種蛋白質的第一個差別，研究了分離測定它們的具體條件。實驗過程和結果如下：

取人血清 0.05—0.1 毫升，用水稀釋 50 倍，加 HCl 調到 pH 2—3 後，在沸水浴中煮

10 分鐘。冷卻,用 NaOH 中和到 pH 6.0。離心分出變性球蛋白。用水洗滌沉澱兩次後,用雙縮脲反應測定沉澱中蛋白質含量。另取血清樣品,用雙縮脲法測定總蛋白含量。總蛋白-球蛋白=血清清蛋白。

另用亞硫酸鈉法測定計算同樣血清樣品中的清蛋白和球蛋白含量。部分結果如附表。

表 1 人血清中清蛋白和球蛋白百分含量

| 血清編號 | 總蛋白 | 變性法 | | | 21% Na ₂ SO ₃ 法 | | |
|------|------|------|------|-----|---------------------------------------|------|-----|
| | | 清蛋白 | 球蛋白 | 清/球 | 清蛋白 | 球蛋白 | 清/球 |
| 1 | 6.88 | 4.94 | 1.94 | 2.5 | 4.32 | 2.56 | 1.7 |
| 2 | 7.88 | 5.56 | 2.32 | 2.4 | 5.56 | 2.32 | 2.4 |
| 3 | 7.22 | 5.50 | 1.72 | 3.2 | 4.88 | 2.34 | 2.1 |
| 4 | 7.80 | 4.74 | 3.06 | 1.6 | 4.94 | 2.86 | 1.7 |
| 5 | 7.38 | 5.32 | 2.06 | 2.6 | 4.68 | 2.70 | 1.7 |
| 6 | 6.00 | 3.88 | 2.12 | 1.8 | 3.44 | 2.56 | 1.3 |
| 7 | 8.00 | 6.18 | 1.82 | 3.4 | 5.62 | 2.38 | 2.3 |

從附表可以看出,和亞硫酸鈉法相比,用本方法分析血清清蛋白的結果趨勢偏高,其誤差亦似較大。這可能因為球蛋白變性沉澱不完全。分離測定血清中這兩種蛋白質的具體實驗條件還須進一步探索改進。

酰化作用對木瓜蛋白酶活性的影響

陳同度 周德明

(北京大學生物學系生物化學教研室)

Smith 等曾證明用亞硝酸處理木瓜蛋白酶,把賴氨酸的 ϵ -氨基轉變成羰基後,木瓜酶失去活性。但用甲基異脲處理木瓜酶把賴氨酸的 ϵ -氨基轉變成胍基時,活性不變。因此,賴氨酸的 ϵ -氨基似為木瓜酶表現催化作用的必需基團。已知乙酰酮和乙酸酐等乙酰化劑主要作用於蛋白質的氨基。我們研究了乙酰化作用對於木瓜酶活性的影響。結果證明乙酰化木瓜酶的催化活性比木瓜酶顯著地降低。

我們使用的兩批木瓜酶是從 1:350 粗木瓜酶商品提制的。木瓜酶 I (簡寫 PI) 對 L-亮氨酸胺和苯甲酰精氨酸胺 (簡寫 BAA) 的比活性分別為 0.069 和 0.40, 木瓜酶 II (簡寫 PII) 對這兩種底物的比活性分別為 0.071 和 0.37。制備乙酰木瓜酶使用的乙酰化劑為乙酸酐,乙酰化作用在含有乙酸鹽的磷酸緩衝液 (pH 7—8) 中,在 1—3°C 下進行。乙酰木瓜酶 I (Ac PI) 的酰化程度為每克分子酶, 28.3 克分子乙酸, 乙酰木瓜酶 II (Ac PII) 的酰化程度為 15.8 克分子乙酸。木瓜酶酰化程度是按照標準方法測定的。

Ac PI 和 Ac PII 在水中溶解度很低,我們使用它們的 1 M 尿素溶液。在 1 M 尿素溶液中它們在室溫下的溶解度分別為 0.53 和 0.98 毫克氮/毫升。

測定木瓜酶 I (PI) 和乙酰木瓜酶 (Ac PI 和 Ac PII) 反應混合液的總體積為 1 毫升, 其中各組份的濃度為 40 mm 磷酸緩衝劑 (pH 7.0), 0.58 mm EDTA, 7.5 mm KCN、12 mm 亮氨酸胺 (底物) 和 0.5 M 尿素 (來自酶溶液)。酶的濃度為 0.045—0.25 毫克氮/毫升。應當指出, 我們另有實驗證明 0.5 M 尿素並不影響木瓜酶的活力。

我們的實驗結果證明, 如果以木瓜酶 I (PI) 對亮氨酸胺的活力為 100, 乙酶木瓜酶 I (Ac PI) 和乙酰木瓜酶 II (Ac PII) 的活力分別為 7.1 和 24。結果說明乙酰化作用顯著的降低了木瓜酶的活性, 乙酰化的程度越大, 木瓜酶活力降低的越多。

大白鼠在組織缺氧狀態下大腦皮層 不同層內乳酸的積累過程

王 鏡 岩

(北京大學生物學系生物化學教研室)

大腦對缺氧的高度敏感性引起人們對於缺氧問題的興趣。研究缺氧時腦組織化學成分的變化, 對於深入理解缺氧現象有很重要的意義。

本工作的目的是研究在斷頭缺氧時大腦皮層不同功能區(運動區和視區)之不同細胞層內乳酸的積累過程。

實驗材料為大白鼠的大腦半球, 腦重一般為 1.6 克左右。

引起動物缺氧的方法是用剪刀將動物之頭部迅速剪下後, 在室溫放置 1—10 分鐘, 然後用液態氧固定。正常動物的處理係將整體在液態氧中固定。

我們共進行了三組實驗:

第一組實驗: 測定大白鼠大腦半球中的乳酸含量。

第二組實驗: 測定大腦皮層運動區和視區不同層中乳酸含量。

第三組實驗: 測定斷頭缺氧時大腦皮層運動區和視區不同層中的乳酸含量。

腦區的劃分是根據 Woolsey (1952) 圖譜進行的。皮層切片的制備使用冰凍切片機。切片時組織之溫度嚴格控制在 -2°C 以下, 冰凍切片機上的切片刀事先用液態氧進行了冷凍。

所得之皮層切片實際相當於皮層之哪一層係由蠟切片法觀察所確定。

乳酸的定量使用了 Barker 及 Summerson (1941) 的方法。此外並在部分實驗中應用了乳酸脫氫酶測定法, 為此對該方法中的某些實驗條件作了一些探討。

實驗結果表明, 大白鼠的大腦皮層實際分為五層。在運動區和視區的腦皮層厚度不完全一致。但是不同個體同一腦區的同一組皮層切片所含的細胞層基本上是一致的。

正常鼠大腦半球中乳酸含量平均為 17 ± 4.6 毫克 (鮮重)。正常鼠大腦皮層運動區和視區不同層中的乳酸含量, 在運動區和視區的不同細胞層之間以及在不同區域之間, 都沒有發現明顯的差別, 皮層的乳酸含量略高於全腦。

在缺氧時，乳酸含量不只在不同細胞層間以相等的速度增加，而且在不同區域之間也等量的升高。乳酸含量的增加和缺氧時間有一定關係，斷頭後 1 分鐘乳酸比正常狀態增加了 3—4 倍。2 分鐘增加到 5—6 倍，5 分鐘增至 6—7 倍。隨時間的延長酵解強度不斷減弱。斷頭後 10 分鐘即看不到乳酸含量的明顯變化。

缺氧狀態下小鼠及大鼠腦中氨基移換 酶及乳酸的一些變化

王鏡岩 劉展環·包永德

(北京大學生物學系生物化學教研室)

我們在以前的工作中曾發現，缺氧時腦組織中乳酸的含量超過了葡萄糖和糖元所能轉變的總和。因此提出了在缺氧時乳酸可能由其他非糖物質，特別是氨基酸轉變而來。研究在缺氧時腦組織中氨基移換酶的活性變化，對於了解腦組織利用非糖物質作為能量來源的可能會提供線索。

本文研究了在缺氧時大鼠和小鼠谷一門氨基移換酶活性的變化。此外也探討了大鼠和小鼠在缺氧時是否表現出酵解強度的差異。

實驗材料為成年大鼠和成年小鼠的全腦。氨基移換酶活性的測定主要根據 Tonhazy (1950) 的方法。

造成缺氧的方法：體外缺氧採用 Thunberg 管減壓抽氣的方法。體內缺氧是將動物放入氣壓室內減壓。

測定乳酸時所造成的缺氧方法是將動物斷頭後在室溫停放不同的時間，然後立投入液態氮中。對照實驗是將動物整體在液氮中固定。

實驗結果表明，大白鼠和小白鼠無論在體外和體內缺氧，腦組織中的谷一門氨基移換酶的活性都有所增高，尤其體外缺氧時更為明顯。正常對照動物腦中的轉氨酶活性在大白鼠高於小鼠。而在缺氧條件下，小白鼠的轉氨酶活性比大白鼠有更明顯的增高。

缺氧狀態下大白鼠和小白鼠腦中乳酸增加的絕對量有較顯著的差異，說明大白鼠的酵解強度高於小白鼠。但是這一差異主要是在斷頭缺氧 3 分鐘以後形成的。

降低體溫和 X 綫照射對大白鼠肝、脾和 十二指腸磷濃度和磷更新率的影響

胡美浩 王素雲 李芬芬 高天禮 李建武

(北京大學生物學系放射生物學教研室)

本實驗目的在於對“降低大鼠體溫能否對 X 綫照射的損傷有防護作用，及其作用機制”問題提供資料。幼年大白鼠 70 隻，雌雄都有，體重在 32—120 克之間。分為四組：即不加任何處理的對照組；用冰水降低大鼠肛溫至 18°C，並在 4 小時內恢復體溫的降溫組；大鼠全身受到 X 綫 500 γ 一次照射的輻射組；和在降低體溫的條件下全身照射 500 γ 的低溫輻射組。各組都在處理後 4 小時左右注射用 P^{32} 標記的 Na_2HPO_4 稀釋液 (0.114 M)，腹腔注射，每克體重注射相當 0.05 微居里放射活性的 P^{32} ，估計約為 0.035 毫克/克體重的無機磷。注射後再隔 4 小時左右殺死大鼠，取出肝、脾、十二指腸樣品 30—60 毫克濕重，測定樣品中的總磷濃度和磷的更新率。

測定結果表明：大鼠肝、脾、十二指腸各含磷平均為 3.19, 3.27, 1.80 毫克/克濕組織；肝、脾的個體差異甚大。降低體溫使肝、脾的磷濃度下降，個體差異縮小。輻射亦有同樣效果。這可能由於這些器官充血，使磷的濃度下降。大鼠組織的磷更新率用 P^{32} 的相對活性(千脈衝/分鐘/毫克磷)來表示。大鼠肝的磷更新率最高，十二指腸次之，脾最慢。降溫和輻射處理都增快了脾和十二指腸的磷更新率。大鼠在降低體溫條件下受到 X 綫照射，肝和脾的磷濃度仍下降；但脾和十二指腸的磷更新率就不像單獨受到 X 綫照射處理的大鼠那樣增快。

X 射綫對小家鼠雄性生殖細胞作用的 電子顯微鏡與組織化學觀察

翟 中 和

(北京大學生物學系放射生物學教研室)

用電子顯微鏡技術與組織化學方法觀察了小家鼠精原細胞與精子細胞在 300 倫 X 射綫作用後第 5 天的損傷與結構變化，並觀察到以下一些現象：

精原細胞大量壞死，並表現為各種階段的損傷與破壞類型，最嚴重的是各細胞器結構破壞，整個細胞由無數大小不同的空泡組成，核內的最小基本顆粒與絲狀結構 (100—200 Å) 與胞漿內核膜微粒完全消失，這時組織化學染色表明 DNA 與 RNA 完全消失。

精子細胞一般表現為：1. 核內電子密度很大，對 Schiff 試劑與甲基綠具有正反應的索狀結構(粗 1000—2000 Å)破壞與消失。大小約為 300—400 Å 的較大顆粒增多。核的中央普遍出現圓形濃縮點(1500—2000 Å)。2. 大部分粒綫體的內陷結構消失。

蛋白質分子的電子結構與催化作用

張 華

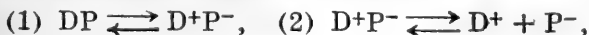
(北京大學物理系)

我們曾用能帶論[化學學報, 28 (1962), 132]闡明蛋白質分子中電子轉移的機理。經計算, 得到禁帶寬度為 5.6 電子伏特, 導帶寬度為 0.8 電子伏特。理論值和實驗符合。但由於禁帶太寬, 多肽並非半導體。

在本文中我們用量子力學方法計算蛋白質分子和非蛋白質分子所形成的絡合物的電子能譜和提出以化學反應的方式完成量子態躍遷的理論, 從而有助於探討生物催化電子論和生物半導體性質的關係。

計算表明, 如果蛋白質分子和電子施主分子(或受主分子)組成電荷遷移絡合物時, 則在導帶下面出現一定域化的絡合物基態能級和一定域化的電荷遷移激發態能級。後者是束縛着的一對“電子—空穴”態。在外界條件激發下, 絡合物首先由基態(非極性態)躍遷到電荷遷移激發態(極性態)。然後再由電荷遷移激發態躍遷到導帶, 相當於“電子—空穴”態被解離, 隨之在導帶中出現自由電子。這樣就由一個能級距離較大的躍遷過程($\Delta E = I - A$)分解為兩個能級距離較短的躍遷過程($\Delta E_1 \cong I - A + Q$ 和 $\Delta E_2 \cong -Q$ 且 $\Delta E_1 + \Delta E_2 = \Delta E$, 這裏 I 是電子施主分子的電離能, A 是電子受主分子的電子親合勢, Q 是電子—空穴的庫侖作用能)。

因此, 絡合物在吸收 $h\nu_1 = \Delta E_1$ 和 $h\nu_2 = \Delta E_2$ 的光量子後, 就會在導帶中出現自由電子。這就是通常的由光子激發所引起的量子態躍遷。但值得指出, 在生物體中有可能以化學反應的形式來完成上述量子態的躍遷, 從而產生電子轉移和半導體性質。因為在蛋白質分子絡合物中的電子遷移過程和氧化—還原反應之間存在着一定的對應關係。蛋白質分子 P 和電子施主分子 D 所組成的電荷遷移絡合物 DP 就構成氧化—還原體系的“初始狀態”。反應按下列過程進行:



過程(1)是極性和非極性絡合物的互變反應, 在電子能譜上對應於絡合物基態和電荷遷移激發態之間的躍遷過程。過程(2)是極性絡合物的解離反應, 反應產物是自由基。在電子能譜上過程(2)相當於把電荷遷移激發態解離為帶“空穴”的 D^+ 和帶一個自由電子的蛋白質分子 P^- 。在解離過程中, 隨着 D^+ 和 P^- 間距離的增長, 定域化電荷遷移激發態能級的位置就隨之上升, 最後和導帶重合, 在導帶中出現自由電子。過程(3)表示蛋白質離子 P^- 在使電子受主分子 A 還原後, 恢復至原態 P。在電子能譜上過程(3)相當於

在導帶中運動的自由電子被電子受主分子 A 所俘獲。

因此，在氧化——還原過程中，蛋白質分子絡合物必有半導體性質，而氧化——還原反應又是藉助於電子轉移來完成的。通常這類化學反應實際上是存在的。另一方面，不能由以上分析，得出絡合物有半導體性質必伴有氧化——還原反應的結論。因為處於固態的絡合物，用光子激發的躍遷，通常可看為是按絕熱方式進行的。

如果我們考慮生物體內極性介質（水溶液）和絡合物的相互作用，則定域化能級和導帶的距離相對地會有所縮短，這很有利於反應的進行和量子態的躍遷。

上面提出的以電荷遷移激發態作為化學反應中間態的理論和以化學反應來實現量子態躍遷過程的理論能初步解釋一些實驗事實。例如黃素蛋白形成電荷遷移絡合物，確有電荷遷移吸收光譜。在一些氧化——還原反應過程中和在光子激發的躍遷過程中都發現有非偶電子的電子順磁共振信號。實驗亦證明，一些蛋白質分子和非蛋白質分子所組成的絡合物確有半導體性質。

生物高分子中激子和空穴的轉移

張 華

（北京大學物理系）

我們曾用激子和空穴模型研究正烷屬烴分子的能量轉移和電離問題，計算電子能譜、電離能及能量轉移幾率與分子鏈長度的關係。得到的初步結論和實驗符合。本文將着重探討生物高分子中激子方式的能量轉移問題和電離問題。

生物高分子如多聚核苷酸和由氫鍵聯接的多肽 $(\cdot\cdot\text{CO}-\text{NH}\cdot\cdot)_N$ ，是分別以核苷酸和氨基酸 $(-\text{CO}-\text{NH}-)$ ，作為單體形成一種有平移對稱性的綫型分子鏈。單體間存在着一定的弱相互作用。分子鏈被激發往往體現為鏈中一個（或數個）單體被激發，被激發的單體不定域於某個位置，而在整個分子鏈中運動，形成非定域化激子。經過計算，得到一個基態能級和 N 個公有化的激子能級，後者形成寬度為 $4M'$ 的激子能帶 (M' 是激子和相鄰單體的相互作用能，並且 $M' < 0$)。由基態能級到導帶底部的距離為：

$$\Delta E_N = \Delta E_1 + 2M' \cos \frac{\pi}{N+1}$$

這裏 ΔE_1 和 ΔE_N 是一個單體和含 N 個單體分子鏈的激發能。因此，電子吸收光譜隨分子鏈中氫鍵數目的增加而向長波位移。

分子鏈被電離往往體現為鏈中一個（或數個）單體被電離，形成空穴。由於空穴和相鄰單體的相互作用（作用能用 M^a 表示，通常 $M^a < 0$ ），因此在分子鏈中空穴具有非定域化的性質。經過計算，得到含 N 個單體分子鏈的電離能 I_N 為：

$$I_N = I_1 + 2M^a \cos \frac{\pi}{N+1}$$

這裏 I_1 是單體的電離能。因此，電離能隨分子鏈中氫鍵數目的增加而下降，而隨着分子

的變性,電離能相應地有所升高。由於激子和空穴的非定域化性質,分子鏈中局部損傷的幾率變小。對蛋白質分子,上述現象得到一些實驗的證明。

計算還表明,如果分子鏈和周圍的分子(如介質)之間按共振機理轉移能量,則分子鏈接受周圍分子的激發能的幾率與分子鏈長度成正比。

上面得到的一些初步結論和人工合成的有機高分子的實驗事實符合,亦能解釋現有的一些生物高分子方面的實驗事實。例如,經 γ 射綫照射的蛋白質,確有非定域化電子(空穴)的順磁共振信號。實驗亦表明,變性蛋白質通常是失去局部或全部的氧化——還原反應的功能。看來,變性蛋白質的電離能變高和能帶被破壞是活性消失的重要原因之一。

白地霉細胞中甘露醇的鑑定 及其形成機制的研究

張樹政 黎膏翔

(中國科學院微生物研究所,北京)

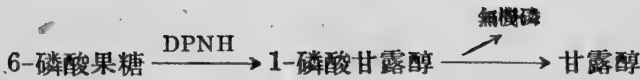
我們在進行白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 戊糖代謝的研究時發現無論在葡萄糖上或木糖上培養的白地霉其細胞中均有大量的多元醇(6—7%乾重)經過鑑定,證明是甘露醇。白地霉菌體用80%乙醇提取,經紙層析純化後,再由無水乙醇中重結晶,得白色針狀結晶,融點 165—166°C (文獻值 166°C)。與已知甘露醇(166°—167°C)之混合融點亦為 165—166°C。製成 2,3,4,5—四乙酸酯衍生物融點為 124—5°C。文獻值(123—5°C)。已知甘露醇的衍生物及二者之混合物融點均相同。又經紙上層析及紙上電泳分離均與已知甘露醇相同。(見表 I)

表 I 白地霉細胞中甘露醇的紙層析及電泳鑑定

| 化 合 物 | 紙 上 層 析 (R_f) | | 紙 上 電 泳 0.1 M NaVO ₃ | |
|------------|-------------------|-----------|------------------------------------|-----|
| | 酚-水 | 苯-丁醇-吡啶-水 | 外觀距離 cm | 顏 色 |
| 甘 露 醇 | 0.47 | 0.40 | 4.0 | 藍灰 |
| 山 梨 醇 | 0.51 | 0.37 | 5.5 | 黃 |
| 衛 矛 醇 | 0.45 | 0.35 | — | — |
| 白地霉多元醇 | 0.47 | 0.40 | 4.0 | 藍灰 |
| 甘露醇+白地霉多元醇 | — | — | 4.0 | 藍灰 |

雖然很早已知道某些真菌可以形成甘露醇^[1],但關於其形成機制的研究則很少,一直未能解決,近來 Yamada 等^[2]指出在稻瘟病菌 (*Piricularia oryzae*) 中甘露醇形成途徑如下式:

技術助理 那淑敏

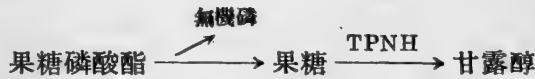


我們的研究結果與此不同，是果糖而非其磷酸酯通過甘露醇脫氫酶的作用直接還原為甘露醇。

在葡萄糖上及木糖上培養的白地霉無細胞提取液均可以催化果糖被 TPNH 所還原，用分光光度計在波長 340 毫微米處可以觀察到因 TPNH 被氧化而引起的光密度的下降 ($\Delta O. D./3 \text{ 分鐘} = -0.09$)。以果糖磷酸酯代替果糖則無相似作用，光密度變化與內作用相近，反而稍有上升。果糖還原的產物也用紙上層析鑑定為甘露醇。並且在反應過程中果糖的減少與甘露醇的生成接近準量關係。

在葡萄糖上培養的白地霉，其無細胞提取液不能催化果糖被 DPNH 所還原，亦不能催化甘露醇被 DPN 所氧化。可知催化果糖還原為甘露醇的酶需要 TPNH 為氫供體。在木糖上培養的白地霉可以催化果糖被 DPNH 所還原 ($\Delta O. D./3 \text{ 分鐘} = -0.235$) 以及山梨醇被 DPN 所氧化 ($\Delta O. D./3 \text{ 分鐘} = +0.121$)。但不能催化甘露醇被 DPN 所氧化。這是由於在木糖上培養的菌體適應生成了木糖醇脫氫酶，而木糖醇與山梨醇在第 2, 3, 4 碳原子之空間結構相似，因而有以上反應。

白地霉細胞中有磷酸酯酶活力 (0.50 微克分子無機磷/毫克蛋白/小時)。因此推測甘露醇的形成機制如下：



這與 Yamada 等的結果不同。在一些細菌中有需要 DPN 的甘露醇脫氫酶^[3]，尚未見有需要 TPN 的甘露醇脫氫酶，我們所提出的有可能是一個新酶，尚待進一步研究證明。

文 獻

- [1] Foster, J. W.: Chemical Activities of Fungi, Academic press. Inc. New. York. 1949, p. 470.
- [2] Hiromi Yamada, Koji Okamoto, Kayoko Kodama, Shozo Tanaka, Mannitol formation by *Piricularia oryzae*. Biochim et Biophys. Acta. 1959, 33, 271—3.
- [3] Arcus, A. C. & Edson, N. L.: Polyol dehydrogenase. 2. The polyol dehydrogenase of *Acetobacter suboxydans* and *candida utilis*. Biochim. J. 1956, 64, 385.

人工肝臟功能障礙動物的精氨酸 負荷試驗的研究

單鴻仁 康效岩 史愛芬

(山西醫學院生物化學教研組)

肝臟是動物機體最重要臟器之一，它在物質代謝中起着重要作用，而且具有極大的潛在力量和代償功能，如果部分肝臟發生機能障礙時，從其物質代謝產物的改變，往往不能發現其障礙程度，目前，在臨床一般根據病人血中某些酶類的變化，來推測肝臟功能的障礙程度，實際上，這並不能完全反映出肝臟實質變化的真實情況。因為血中酶類的變化，和細胞膜的通透性，酶分子的大小，酶在細胞內的存在狀態，血中抑制物與激活物的存在，以及動物的全身機能狀態等，都有密切關係。一般認為比較理想的方法，是從動物整體進行研究。

從動物整體研究肝臟在代謝中的功能；在糖代謝方面，過去有半乳糖負荷試驗，在含氮物質代謝方面，除了鉍鹽負荷試驗外，其它方面的資料尚少，我們想先在動物身上進行精氨酸負荷試驗，然後進一步應用於臨床。

實驗方法與結果概括如下：選擇健康家兔一組，先進行精氨酸負荷試驗，經一定期間，用 CCl_4 形成肝臟功能障礙動物模型，然後再進行同樣的負荷試驗。

具體方法是：將家兔空腹採血後，按每公斤體重注射精氨酸 ($\text{pH}=7.3-7.4$) 100 毫克。然後按 10 分，30 分，60 分，90 分及 120 分間隔進行採血，測定其血中精氨酸與尿素的含量。

經數日後，上面的實驗家兔按每公斤體重，經一小時的間隔注射 CCl_4 ：0.4/kg, 0.2/kg, 0.1/kg, 0.05/kg 毫升，經 24 小時後，按上述方法，再進行同樣的負荷試驗。

精氨酸的測定是按 Sakaguti 及 Weber 氏法尿素的測定是按脲酶法進行的。

我們共做了 11 家兔；注射 CCl_4 前的精氨酸負荷試驗，11 家兔中有 5 只在負荷後 60 分鐘恢復原來水平。有 6 只在 90 分鐘恢復原來水平。但注射 CCl_4 後的負荷試驗，11 家兔在 120 分鐘都未恢復負荷前的水平，由此看出家兔注射 CCl_4 後，其精氨酸的代謝速率顯著降低 (表 1)。

表 1 負荷後家兔血中精氨酸含量的變化

| | 負荷前血中 精氨酸的含量 mg % | 負荷後血中精氨酸的含量 mg % | | | | |
|-----------------------------|-------------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 10分鐘 | 30分鐘 | 60分鐘 | 90分鐘 | 120分鐘 |
| 正常家兔的負荷試驗 | 0.74 ±0.16 | 8.00 ±0.72 | 5.12 ±0.80 | 1.05 ±0.36 | 0.70 ±0.15 | 0.73 ±0.14 |
| 負荷後精氨酸降低率 | — | — | 36.0% | 86.9% | 91.2% | 90.8% |
| 注 CCl_4 後的負荷 試驗 | 0.77 ±0.22 | 8.24 ±1.00 | 6.14 ±0.79 | 3.84 ±0.56 | 2.44 ±0.49 | 2.14 ±0.51 |
| 負荷後精氨酸降低率 | — | — | 25.4% | 53.4% | 70.3% | 74.0% |

其次，從家兔血中尿素的變化看出：

(1) 注射 CCl_4 後，其血中尿素含量比正常時增加。

(2) 注射 CCl_4 後 24 小時進行精氨酸負荷試驗時，其血中尿素的升高率比正常為低 (表 2)。

表 2 負荷後家兔血中尿素含量的變化

| | 負荷前血中尿素的含量 mg % | 負荷後血中尿素的含量 mg % | | | | |
|-------------------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | | 10分鐘 | 30分鐘 | 60分鐘 | 90分鐘 | 120分鐘 |
| 正常家兔的負荷試驗 | 20.39 ±1.84 | 20.87 ±1.73 | 27.08 ±2.35 | 29.52 ±2.67 | 31.19 ±3.03 | 30.5 ±2.73 |
| 尿素升高率 | — | — | 22.9% | 29.3% | 33.0% | 31.5% |
| 注 CCl_4 後的負荷試驗 | 26.31 ±2.01 | 26.95 ±1.91 | 30.8 ±2.76 | 34.1 ±2.81 | 34.5 ±2.10 | 33.8 ±3.16 |
| 尿素升高率 | — | — | 12.5% | 20.9% | 21.8% | 20.0% |

由上面二個實驗結果綜合看出：在家兔注射 CCl_4 後的負荷試驗中，其精氨酸代謝速率降低同時，其尿素生成速率亦降低。根據動物肝臟有豐富的精氨酸酶存在，可以說明負荷後精氨酸主要在肝臟受精氨酸酶分解成尿素。因而精氨酸酶是精氨酸分解速率的限制因素。因此，由此試驗中的精氨酸分解成尿素的速率，初步可以看出肝臟在精氨酸代謝中的功能。但在動物身上的觀察，是否能應用臨床病人，尚需進一步深入研究。

關於血中惡性磷脂作為癌腫 早期診斷的評價

林文光 劉友堯 吳瑞榮 李光展

(福建醫學院生物化學教研組)

1958年神前武和發表了檢定血中惡性磷脂作為早期癌腫特異診斷以及提取和鑑定腫瘤組織中惡性磷脂的報告。根據該報告所提出方法和惡性磷脂的性質，我們注意了試劑的高度純化，特別是無水，避免酶，陽光和氧的破壞作用；在進行紙上層析過程中更注意了試劑的 pH，溶劑的比例，層析濾紙濕度處理和室溫等條件。在上述條件下完全按原法操作，結果無論正常人的或明確診斷的癌患者的血或患腹水癌小白鼠的腹水等樣本都顯不出清楚的層析圖譜；僅在只用丙酮洗一次或未把丙酮傾倒乾淨的樣本進行層析，結果則可見很淡的層析點，其 R_f 為 0.38, 0.50, 而用無水丙酮洗的次數愈多則所得層析結果更清淡無色。因此設想樣本中提出的惡性磷脂在等體積無水酒精和丙酮的混合液中並沒有沉澱下來，所以我們就將正常人的與癌患者的樣本丙酮洗滌液同時進行層析，結果均在酒精丙酮洗滌廢液中出現明顯的層析點其 R_f 值為 0.38 和 0.51, 與神前武和報告的完全一致。後來我們將原法簡化只用酒精將血液提取一次，提出液真空乾燥後，另用有機溶媒溶解濃縮

也能成功地得到類似以上的層析結果。經過 20 個正常人, 10 個確診癌腫患者的血液和 20 個腹水癌小白鼠腹水樣本檢定結果進行比較分析, 我們認為在這樣條件下沒有性質不同的磷酯存在, 故認為亦不存在惡性腫瘤特有的惡性磷酯。我們看到所有的腹水癌腹水或少數癌腫血有時有較多磷酯, 其中 R_f 為 0.51 的層析點更明顯, 但是並非各種惡性腫瘤的血液樣本都有增加。因此我們同意 1956 年 Haven 和 Bloor 二氏作過討論提出腫瘤生長過程中血裏常出現酯血症, 但不一定有磷酯的增加。我們的結論是惡性腫瘤病人血中按原法未能找到特異的惡性磷酯可供早期特異診斷應用。

本工作過程中承戴金、吳徽淦二同志協助技術操作, 特致謝意。

老范志神麵生化學的研究報告

I. 糖化力的研究

林公際 林文光

(福建醫學院生物化學教研組)

泉州老范志神麵創製於 1724 年, 迄今已 200 餘年, 暢銷海內外。主治調胃健脾, 傷食腹痛, 嘔吐泄瀉及中暑痢疾等症, 一般認為是一種家庭良藥。本研究目的是為了用科學方法證明神麵的療效, 以便進一步改進生產, 提高質量。經過我們初步試驗證明, 老范志神麵對澱粉的消化有顯著作用, 故進一步作糖化力的詳細研究, 並以北京樂家老舖同仁堂出產的神麵作對照試驗, 根據糖化力的測定結果, 得出下列結論:

1. 泉州製藥廠出品的老范志神麵含有糖化酶, 其糖化力甚強, 按每 1 克麵能使澱粉水解產生的麥芽糖毫克數作為糖化力來計算, 最高可達到 445 毫克。
2. 促進糖化作用的糖化酶的最適 pH 範圍, 老范志神麵為 4.0—4.4, 對照品北京同仁堂神麵為 4.4—4.8, 最適溫度都為 50°C。
3. 老范志神麵中所含的糖化酶對酸的耐力較強, 在 pH 2.6 已開始有消化作用, 在 pH 4.0 以下逐步增強, 北京同仁堂神麵耐酸力較弱, 在 pH 4.0 以下時幾乎不顯消化作用。
4. 經對照實驗結果證明老范志神麵是一種促進澱粉質食物消化的有效藥物。
5. 神麵糖化力的測定及實驗結果圖表見全文。

嘧啶核糖核苷酸的比色測定

夏壽萱 施秉儀

(中國人民解放軍後字 231 部隊,北京)

核糖核酸、核糖核苷酸、核糖核苷常藉 5-甲基間苯二酚 (Orcinol) 反應來定量測定。但其中祇有嘧啶核苷和核苷酸的戊糖參加反應,而嘧啶核苷和核苷酸中的戊糖由於結構上的原因極少顯色。有些作者試圖用溴化、氫化、胼解等方法使嘧啶環破裂,從而使戊糖曝露參加反應。但溴化的條件很難控制;氫化需要特殊的催化劑;胼解需在無水基質中進行,這些都使應用受到限制,至今還沒有簡單滿意的測定嘧啶核糖核苷酸的方法。

脛胺常被用作菌種變異劑。Verwoerd 氏等探討了脛胺與嘧啶核苷酸的作用機制並認為有助於核糖核酸中核苷酸的序列測定。本文報導了嘧啶核糖核苷酸的一種比色測定法。這個方法是應用脛胺與嘧啶核苷酸的反應,然後用 5-甲基間苯二酚試劑使戊糖顯色,進行比色測定。

操作的概要是:

(一) 尿嘧啶核苷酸的測定——將適當濃度的試樣 0.2 毫升與鹽酸脛胺的水溶液 (3M, 以 NaOH 調節至 pH 9.0 玻璃電極) 1 毫升置 60° 水浴中保溫 3 小時,加水至 2 毫升,加 5-甲基間苯二酚試劑 5 毫升,混勻,在沸水浴中加熱 20 分鐘,冷卻,在光電比色計上用 650 毫微米濾片比色。另用已知濃度的標準樣品繪製標準曲線。

(二) 胞嘧啶核苷酸——操作與 (一) 相似,但脛胺溶液的 pH 為 7.0 (玻璃電極),保溫時間 1.5 小時。保溫後用濃 NaOH 調節 pH 至 10,再於 60° 水浴中繼續保溫半小時,加水至 2 毫升,加 5-甲基間苯二酚試劑,顯色如上。

作者並就脛胺濃度, pH, 保溫的時間和溫度,核苷酸濃度等條件與顯色的關係作了探討,並且也觀察了在脛胺處理過程中嘧啶核苷酸紫外光吸收的改變。

當嘧啶核苷酸含量在 0.3 微克分子 (約 100 微克) 以下時顯色深度與核苷酸濃度成直綫關係。0.05 微克分子 (約 16 微克) 即能產生足夠的顏色深度。每次取胞嘧啶核苷酸 [2'(3')-CRP] 64.6 微克,作 10 次測定,測得的結果為 63.48 ± 5.83 微克,平均回收率 98%; 每次取尿嘧啶核苷酸 [2'(3')-URP] 64.8 微克,作 8 次測定,測得的平均值為 64.4 ± 1.73 微克,平均回收率 99.3%。在上述條件下胞嘧啶核苷酸的顯色率為 D-核糖的 78.7%,為嘧啶核苷酸的 88%; 尿嘧啶核苷酸的顯色率依次為 60.5% 和 68%。雖然未能全部顯色,但因在一定濃度範圍內核苷酸含量與反應光密度成正比,仍能用於定量測定。

對於胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸的混合物,利用它在兩種不同 pH 條件下的不同顯色程度,可以求得各別核苷酸的近似含量。同樣的原理也可應用於嘧啶核苷酸的區別和鑑定。

上述方法同樣適用於嘧啶核糖核苷的測定。

對於核糖核酸的含量測定本方法的靈敏度比不用脛胺處理的 5-甲基間苯二酚法的靈敏度為高。

主要參考文獻

- [1] Mejbaum, W.: Z. physiol. Chem. 258, 117, (1939).
[2] Verwoerd, D. W. et al: Nature. 192, 1038, (1961).

血清對巰基化合物氧化速度的影響

吳 蔚 吳祖澤

(中國人民解放軍後字 231 部隊,北京)

我們用電流滴定法測定了狗在靜脈注射半胱氨酸後的消長曲線^[1]。由於藥物迅速在全身分佈及參與生化代謝等原因,在血液中巰基含量很低,消失速度很快,作者以較為穩定的谷胱甘肽(GSH)作為典型的巰基化合物,進一步探討了血清對巰基化合物氧化速度的影響。

以一定量的 GSH 溶液加入血清中,使 GSH 量在溶液中濃度約為 3 $\mu\text{m}/\text{ml}$ 。血清與 GSH 水溶液體積之比為 15:1。混合溶液在 $37 \pm 0.05^\circ\text{C}$ 的恆溫水浴中保溫,並不斷以 37°C 水蒸氣飽和的空氣通過溶液。混合後不同時間,各取出樣品 0.5 毫升,在硝酸鉍緩衝液中,以標準 GSH 溶液作反滴定。以每毫升溶液中 SH 含量對時間作圖,可以得到不同的 GSH 的氧化速度曲線:

(1) GSH 在 0.66 M pH 7.4 的磷酸緩衝液中保溫 30 分鐘,巰基含量基本不變,以後逐漸下降,具有 S 形的動力學曲線。濃度降低一半所需的時間為 173 分。

(2) GSH 在血清中氧化速度極快,混合後立即下降,濃度降低一半時間僅 16.6 分。

(3) 血清相繼地經含有乙二胺四乙酸(EDTA)鈉鹽的生理鹽水,生理鹽水及 0.66 M pH 7.4 的磷酸緩衝液的透析,測定血清透析液對 GSH 氧化速度的影響。GSH 含量在混合後立即下降,其曲線介於上述二曲線之間。GSH 濃度降低一半所需時間為 88 分。

(4) 血清對照在上述實驗條件下保溫,對血清蛋白的巰基含量沒有明顯影響。

Oberst^[2]認為血清蛋白是使 GSH 消失的因素,其影響程度與蛋白質性質有關。比較上述實驗結果,我們認為在血清中造成 GSH 催化氧化的物質,主要為金屬離子,蛋白質亦有一定的影響。

血清經 EDTA 透析後,仍保持部分催化 GSH 氧化的能力,推測其原因不外乎:

(1) 血清雖經 EDTA 較長時間的透析,尚未能使全部的金屬離子除去;(2) 血清內含有與蛋白質結合較為鬆弛的金屬離子;(3) 含金屬的蛋白質,例如帶有銅離子的 Ceruloplasmin 的存在。GSH 極易被這些金屬離子所催化氧化。至於在結合狀態下,是否還保持其特性,尚待進一步的探索。

主要參考文獻

- [1] 吳 蔚,吳祖澤,謝顯華:“半胱氨酸在血液中消長速度的研究”,未發表。
[2] Oberst, F. W.: “Studies in Glutathione IV. The disappearance of GSH added to Various Solutions and biological fluids”, J. B. C. [1935] 111, 9.

陳月能,唐秀蘭二同志參加技術工作。

超聲波對牛血清清蛋白某些理化性質及 抗元性的影響

梁植權 王琳芳 潘華珍 王來呷

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

本研究採用超聲波為蛋白質變性的條件,觀察經超聲波處理後牛血清清蛋白的某些理化性質及抗元性的改變,從而對蛋白質結構與功能關係有進一步的了解。

牛血清清蛋白是採用 Nitshman 等簡化的 Cohn 10 法提取,再用正丙醇提純^[1],提純之清蛋白在 Antweiler 微量電泳儀及紙上電泳法鑑定呈現一個峯。取 1% 左右的清蛋白水溶液,置於平底玻璃管中,用捷克 Kovo 250 W 超聲波發生器處理,輸入功率 100 W (電壓 1000 V,電流 100 mA),分別以 2'、4'、6'、8'、10' 處理,處理時之溫度維持在 25°—29°C。

我們研究了超聲波處理後對下列性質的影響:粘度,擴散係數,比旋光度,分子量,紫外吸收光譜,化學基團,及抗元性。粘度是用 ubbelöhde 粘度計測定^[2],擴散係數用 Antweiler 微量電泳儀測定。比旋光度用 Franz Schmidt & Haensch 型旋光儀測定。分子量採用 Nash 和 Thompson 廠電子滲透壓計測定。化學基團中的羧基應用 Kolthoff 電流滴定法測定^[3],羧基氨基和酚基、異咪唑基,採用電位滴定法^[3]。抗元性測定中包括滴度、瓊脂擴散^[4]、免疫電泳^[5]三個指標。

超聲波處理後,特性粘度 $[\eta]$ 稍有上升,說明牛血清清蛋白的分子經過超聲波處理後有些鬆散,但鬆散的程度並沒有影響分子的對稱性,因為牛血清清蛋白處理前後的還原粘度對濃度的依賴關係基本是一致的。擴散係數稍有降低,分子量自原來 69000 增高到 76000—77000,但在不同時間的處理過程中,分子沒有隨時間之延長而有解聚或聚合的現象。不同 pH 條件下旋光度沒有改變,在 pH 4—10 之間皆在 -60 — -62 $\text{pH}=3$ 以上,(pH=10 以下左旋旋光度有顯著上昇)說明螺旋構型沒有變化。羧基是隨時間的加長而逐漸下降。羧基、氨基加酚基之數目處理後減少。但似在 2 分鐘時已接近改變的最高點,繼續延長處理時間,作用不甚顯著。紫外吸收光譜最高吸收峯沒有改變。

超聲處理後,抗元滴定未見降低,仍是 1:5000,瓊脂擴散圖上呈現一條沉澱綫,不同時間處理後的沉澱綫皆能與正常牛血清清蛋白連接成一綫。免疫電泳圖譜上亦與正常牛血清清蛋白的沉澱一樣,出現一條對應的弧綫,仍保留原有抗元性。

主要參考文獻

- [1] 王琳芳,梁植權:科學記錄 4, 388, 1960.
- [2] Koethoff: Anal. Chem. 18, 161, 1946.
- [3] Tanford: J. A. C. S. 77, 6414, 1955.
- [4] 王琳芳,梁植權:科學記錄 4, 395, 1960.
- [5] Grabar: Биохимия. 22, 49, 1957.

蛋白二硫還原酶的提純和性質的初步研究

李士諤 趙德臻 朱式玉*

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

1956年 Nickerson^[1] 等報告在酵母中存在有蛋白二硫還原酶,並認為此酶與細胞分裂有關。以後 Hatch^[2] 在發芽的豌豆中也發現有此酶,並對此酶的性質作了初步研究。但尚未見有關動物組織中此酶的報導。在我們的初步試驗中觀察到某些腫瘤組織如肝癌、網質細胞肉瘤以及小鼠胚胎、再生肝等都具有此酶活性,而正常肝則無。為了解此酶的生理功能以及與腫瘤生長的可能關係,我們進行了它的提純和某些性質的研究。

酶反應系統為底物蛋白質 8—20 毫克, TPN 0.044 μ mole, G-6-P 3 μ mole, G-6-P 脫氫酶 1.2 毫克, 酶蛋白 1.5—7.5 微克, Tris 26 μ mole pH 7.5, 總體積 400 微升。反應在含有氮氣的 Thunberg 試管內進行。於 30°C 保溫 15 分鐘後,加入 5 微升 5 N NaOH 以停止酶反應,取出 25—50 微升測定蛋白 -SH 莖。酶活性以反應後所生成之微當量 -SH 莖/克底物蛋白質表示於上述反應系統中,除緩衝液外,去除任何一種物質,都不表現有酶活性,或酶活性很低。

底物蛋白質係自成年大鼠肝中提取,先將灌注後之肝用 0.01 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 製成勻漿,取 0.4—0.7 (NH₄)₂SO₄ 飽和度部分滲於 Tris 緩衝液,對蒸餾水透析至不含 (NH₄)₂SO₄ 為止,冷凍乾燥後即得疏鬆的乾粉。樣品中所含之 -SH 及 -S-S- 基,按 Kolthoff 和 Cartar 方法測定,幾批樣品測得的 -SH/-S-S- 比例約為 2—3。

酶的提純是以大鼠再生肝為材料。取肝部分切除後 48 小時的再生肝,先從冷的生理鹽水灌注,然後以 0.01 M Tris 緩衝液 (pH 7.5, 內含 0.001 M EDTA) 製成勻漿,離心後,於上清液加入固體 (NH₄)₂SO₄, 取 0.3—0.6 飽和度沉澱部分,再經 DEAE 纖維素吸附,分別以 0.01 M Tris 緩衝液 pH 7.5 和含有 0.1 M, 0.2 M 和 0.3 M NaCl 的該緩衝液進行階段洗脫,最後所得酶制劑之活性較粗提取液約提高 100 倍,產量約 32%。

部分提純酶的最適 pH 約 7.6, 酶活性在最適 pH 的鹼性方面迅速下降,在酸性方面較為穩定。最大酶活性所需之底物蛋白濃度約 20 毫克/400 微升反應液。酶反應在 30 度與反應時間不完全呈直線關係。但在反應時間為 15 分鐘的條件下酶濃度與活性呈直線關係。

蛋白二硫還原酶為碘乙酸、對氯汞苯甲酸、氯化汞、Cu⁺⁺、Zn⁺⁺ 所抑制。除大鼠肝蛋白外,酶對於酵母乙醇脫氫酶制劑和己糖激酶制劑都有活性,但對於牛血清清蛋白無活性。經過在 50 度處理 5 分鐘後,酶活力喪失 50%。

根據此酶對於動物蛋白和酵母蛋白 -S-S- 基的作用以及廣泛分佈於動物的一些生

* 現在通訊處:天津市血研所技術衛生學校。

技術協助:許如君。

長迅速的組織如再生肝、胚胎、腫瘤組織來看，此酶可能與細胞分裂和組織的生長有關。值得進一步的研究。

文 獻

- [1] Nickerson W. J.; Falcone G: Science, 124, 318, 1956.
[2] Hatch M. D.; Turner J. F.: Biochem. J., 76, 556, 1960.

艾氏腹水癌小白鼠蛋白質和 核酸含量的研究

方 丁

(河北醫學院生物化學教研組)

利用艾利胥氏腹水癌，首先研究了小白鼠在接種該腫瘤細胞後宿主體內蛋白質和核酸含量的改變，進而研究了由癌細胞中提出的核酸對小鼠體內蛋白質及核酸含量改變的影響。

材 料

動物，本研究中全部用昆明種小白鼠。健康活潑，雄性。體重 19—24 克。喂以固定膳食。

腫瘤，取接種小白鼠第 8 天的艾氏腹水癌予每只實驗小鼠腹腔內接種。然後在接種後第 8 天抽出腹水。用此腹水中癌細胞作為腫瘤材料。

方 法

(1) 腫瘤生長對宿主體內蛋白質和核酸代謝的影響：予實驗組動物腹腔注射第 8 天腹水 0.2 毫升。分別於接種後第 3、6、9 天切頭殺死動物（同時伴有對照組動物）。此時，收集血液，分出血清以備做蛋白質紙上電泳用。立即從殺死動物取出腹水、肝、脾（以上操作均在冷卻條件下進行）。按下述各法分別測定了腹水癌細胞、肝、脾中總蛋白質、脫氧核糖核酸（以下簡稱 DNA_p）、核糖核酸（簡稱 RNA_p）等含量。用紙上電泳方法測出了血清蛋白各部分的比值並測定了血清總蛋白質量。

(2) 癌細胞核酸鹽對正常小白鼠蛋白質、核酸含量的影響。

艾氏腹水癌細胞核酸鹽制備：取接種後第 8 天的腹水癌腹水。離心後棄去上清液。向沉澱倒入冷生理鹽水，洗滌癌細胞。向洗淨的癌細胞加入冰冷的 95% 乙醇 3 體積。於冰箱中放置過夜。吸去乙醇，用甲醇-氯仿，乙醚-乙醇混合液除去脂類。此後將乾燥之瘤細胞分碎。按每克乾細胞加入 10 毫升 10% NaCl 比例加入氯化鈉溶液在冰箱中提取過夜。向提取液中加入 95% 乙醇 3 體積，此時即有核酸鈉沉澱。將此沉澱再溶解在少量

10% NaCl 中，然後再用 95% 酒精沉澱。如此反覆操作精制核酸。最後用無水酒精洗滌核酸鈉二次後，放置在 P_2O_5 乾燥器中乾燥並制成粉末。

由上法制成的癌細胞核酸鈉鹽是白色粉末。易溶於水和生理鹽水中，對雙縮脲反應呈陰性，對 Bial 氏試法和二苯胺試法都呈陽性。經 $80^\circ C$ 乾燥後，該制品含 $N=11.00-12.00\%$ ； $P=5.00-5.95\%$ ； $N:P=2.02-2.22$ 。

正常小白鼠肝核酸鹽制備：制備方法同上。該核酸制品略帶淺黃色，粉末狀。易溶於水和生理鹽水。對雙縮脲試法，Bial 氏試法，二苯胺試法結果同上。經 $80^\circ C$ 乾燥後含 $N=12.43-13.68\%$ ； $P=6.01-6.53\%$ ； $N:P=2.06-2.08$ 。

將小白鼠分成三組：注射癌細胞核酸組，注射正常肝臟核酸組，空白對照組（只注射抗菌素，因為前二組核酸注射液中都含有抗菌素）。實驗動物每週分別接受腹腔注射癌細胞核酸、正常肝核酸液（每毫升含 200 γ ，經用 Beckman DU 分光光度計測定）0.6 毫升。如此連續注射十週。自第 5 次注射後，每週注射後第二天分別由這三組中各取 4 只動物進行肝、脾中蛋白質、 DNA_p 、 RNA_p 含量以及血清蛋白電泳測定。

癌細胞、肝、脾中 DNA_p 和 RNA_p 含量測定按 G. Schmidt and S. T. Thannhauser 氏法^[1]加以改進。總蛋白質測定按 Slater 氏法稍予修改。

結 果

(1) 腫瘤生長過程中宿主體內蛋白質、核酸量改變：

正常小白鼠血清中每 100 毫升含總蛋白 6.65 ± 0.68 克。接種後，自第 3 天起逐漸下降，至動物瀕死時僅有正常含量的 60% 左右。白蛋白正常含量為 5.18 ± 0.89 克%，隨腫瘤疾病加重，其含量逐漸減小，至第 12 天時僅有 1.88 ± 0.51 克%。接種後第三天 α -球蛋白略見上升，第 6 天達到正常含量 (0.86 ± 0.05 克%) 的二倍，此後又下降。正常的 β -球蛋白量為 0.29 ± 0.03 克%，在第 3—6 天均上升 ($0.84-1.45$ 克%)，此後開始下降至很低。 γ -球蛋白正常含量為 0.33 ± 0.04 克%，在接種後均見增加，如接種後第 3 天為 0.57 ± 0.03 克%，第 6 天為 0.55 ± 0.02 克%，第 9 天為 2.28 ± 0.19 克%。但到第 12 天雖較第 9 天為低，仍較正常者為高 (1.41 ± 0.03 克%)。

接種腫瘤後第 3 天癌細胞中含有蛋白質 50.06 ± 2.66 毫克%（以每 100 毫克乾癌細胞計，以下同）， DNA_p 為 2.05 ± 0.10 毫克%， RNA_p 為 8.40 ± 1.14 毫克%，（ DNA_p 、 RNA_p 量以每克癌細胞乾重計）。此後在腫瘤生成過程中的均見到蛋白質、 DNA_p 、 RNA_p 量增加，至晚期（第 12 天）除 RNA_p 較第 3 天為低外，蛋白質量和 DNA_p 含量雖比第 9 天者略見下降，但較第 3 天者均高。

接種艾氏腹水癌後第 3 天動物肝組織中蛋白質、 DNA_p 、 RNA_p 較正常肝組織略增加。第 6 天時肝蛋白較正常對照者 (45.62 ± 4.88 毫克%/100 毫克乾肝組織) 增加了約 6%， DNA_p 增加了約 1.7 倍， RNA_p 增加了約 1.6 倍。第 12 天實驗組肝組織中蛋白質、 RNA_p 、 DNA_p 量雖比第 9 天者略低，但較對照組顯著增加。

接種腫瘤後小白鼠脾組織蛋白質、 DNA_p 、 RNA_p 的改變情況和肝組織中相似。

(2) 腹腔注射艾氏腹水癌細胞核酸鹽對正常小白鼠體內蛋白質、 DNA_p 、 RNA_p 含量的影響：

小白鼠經腹腔注射艾氏腹水癌細胞核酸鹽 7 週後，發現動物肝細胞活躍。雙核細胞

增多,核大小不一。在檢驗 58 例中有此變化者有 38 例,佔總數 71%。其他對照組均無此情況。

實驗組血清總蛋白量在第 7—10 週注射後增加到 7.80—8.62 克%,超過了正常範圍。該組白蛋白量改變情況同總蛋白, α -球蛋白在癌核酸注射第 5—8 週後比正常值增加了約 24%。此後又恢復正常。 γ -球蛋白在第 9、10 週時比對照組增加了 1 倍。實驗組肝蛋白量自第 7 週開始增加,脾蛋白量稍高於正常組。

實驗組肝 DNA_p 量在第 5 週開始增多並逐漸上升(由 0.85—2.21 毫克/克)比對照組高 0.5 至 4 倍,但僅為患腫瘤動物肝 DNA_p 量的 1/2。肝 RNA_p 量改變較小,上升速度緩慢。脾 DNA_p、RNA_p 量自第 7 週開始上升。

對照組均無以上改變。

主要參考文獻

- [1] Gerrard Schmidt and S. T. Thannhauser: Journ. of Biol. Chem., 161, 85—89 (1943).
[2] Slater, E. C.: Biochem. Journ., 45, 1—8 (1949).

磷酸鈣柱層析在動物組織 RNA 的分離及穩定性研究方面的應用

劉士廉 林沁瑛 肖梓仁 劉培楠

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

自 Gierer 和 Schramm (1956) 及 Fraenkel-Conrat (1956) 首先肯定了 TMV-RNA 有致病活性以來,大分子 RNA 的分離及其性質的研究進入了一個新的階段。在若干植物病毒和多種動物腦炎病毒中相繼一再證明了 RNA 是決定感染性的物質以後,DeCarvalho (1961)、Niu (1961,1962) 及 Griffin 和 O'Neal (1962)⁶ 報告了肝 RNA 有抑制腫瘤生長的作用,有誘導分化的作用;Weisberger (1962) 以鐮刀形細胞貧血症患者的紅血球 RNA 與不成熟的紅血細胞保溫後,以電泳、層析等方法分析發現在後者有新種的蛋白質合成。近二年 Nirenberg 等 (1961,1961—1962,1962) 及 Ochoa 等 (1961 a, 1962 a, b, c) 所進行的有關 RNA 決定蛋白質合成的研究,第一次在分子水平上取得了密碼傳遞信息學說的直接證據。這些都說明 RNA 生物學性質的研究在探討細胞分化及惡性變機制中佔有極為重要的地位。

我們為開展正常及腫瘤組織 RNA 性質的比較研究作準備,對應用磷酸鈣膠柱層析法分離及分析 RNA 方面進行了一系列的觀察。

磷酸鈣柱層析過去曾被用來分離蛋白質,Main 和 Cole (1957) 及 Vizoso 和 Burness (1960) 分別以之分離動物組織的 DNA 及高聚合 RNA 也獲得了比較滿意的

技術協助:馬秋霞。

結果。Burness 和 Vizoso (1961) 以小鼠腦心肌炎病毒 RNA 過柱，還證明層析並不導致活性的消失。但 Bernardi 等 (1962) 的結果表明，磷酸鈣柱層析有使高聚合 RNA 全部向低一級降解的作用，因此他們認為不能用此法分離核酸。

我們按 Tiselius 等 (1956) 法製備磷酸鈣結晶。裝柱 8—10 cm × 1 cm (每 cm³ 吸附高聚 RNA 量為 0.7—0.8 毫克)，以區間濃度 (Stepwise, 0.005—0.2 M 磷酸緩衝液, pH 6.8) 洗脫法或濃度連續遞增 (Gradient, 0.8—0.005 M 或 0.4—0.005 M 磷酸緩衝液, pH 6.8) 洗脫法對冷酚法 (雙蒸酚 80%, 0.005 M, pH 6.8 磷酸緩衝液 20%) 製備的大鼠肝、小鼠腦、Rous 雞肉瘤的組織全 RNA 或高聚 (1.2 M NaCl 沉澱的) RNA 作了分析。實驗在室溫進行 (24—29°C)，流速每小時 12 毫升，每管收集 4 毫升。洗脫 RNA 量以 E 258 m μ O. D. 值表示之。多次重複觀察層析條件穩定，回收量在 90—95% 左右。

以大鼠肝高聚 RNA 進行層析，得一單分散相峯，反覆上柱沒有降解現象。以 0.5 N 及 0.3 N NaOH 於室溫 (25°C) 及 37°C 水解此 RNA 再進行分析則得到部分及全部降解的層析圖譜。參考 Спирич (1961) 條件，將此 RNA 於 60°C 保溫 15 分鐘，在 0°C 驟冷，然後再行層析，RNA 分子的洗脫性質沒有改變，和原作者的粘度實驗相符。若將此 RNA 於 90—100°C 處理 2 小時，徐徐冷卻，層析圖譜則出現分子向低聚水平解離現象，但無明顯降解 (按：指無單核苷酸產物)。這些實驗說明磷酸鈣柱層析可以粗略地作為反映高聚合 RNA 分子穩定性的指標。另外，此柱層析法初步觀察還證明 0°C 透析 (對 0.005 M 磷酸緩衝液、pH 6.8)、-14°C 結凍保存 RNA 溶液一週、冷凍乾燥處理 RNA 樣品等對高聚合 RNA 分子沒有顯著影響，但 37°C 透析可使 RNA 分子部分解離。

以磷酸鈣柱層析連續洗脫法分析肝組織全 RNA (酚法所提取的水相原液)，得 4 個洗脫峯 (A、B、C、D)，A 峯為單核苷酸水平分子，B 峯為 <3S 分子，C 峯與 sRNA (4S 左右) 相應，D 峯與 1.2 M NaCl 沉澱的高聚分子相應 (50—100 萬以上分子水平)，紫外光譜分析及各峯 RNA 量的比例。值得注意的是 B 峯的 E 258 m μ /E 230 m μ 的比值在 4 以上，文獻中未見有類似的報告，其生物學性質有待進一步分析。

以上述分析法比較正常小鼠腦及感染腦心肌炎小鼠腦組織的全 RNA，未發現二者有何差別，與肝全 RNA 層析圖譜比較，則見腦的小分子 RNA 含量較少，這種差別可能與二種組織的生理功能以及 RNA 及蛋白質代謝狀況不同有關。

Rous 肉瘤高聚 RNA 層析圖譜與肝、鼠腦等組織的高聚部分洗脫條件類似，反映了動物組織高聚 RNA 分子的共同性。

以腦心肌炎病毒感染的小鼠腦 RNA 檢查磷酸鈣柱層析過程對 RNA 活性的影響，所得結果與 Vizoso 和 Burness (1960) 者一致，即仍保有活性，但較未過柱者有所降低 (未層析者 LD₅₀: <6 r RNA/鼠腦；層析後 LD₅₀: 20 r RNA/鼠腦)。

從上述實驗結果得出的初步結論是：磷酸鈣柱層析可以：(1) 用來作對不同組織 RNA 在組成上的比較研究的一個方法；(2) 用來粗略地反映高聚 RNA 分子的穩定性；(3) 粗略地觀察和鑑定不同條件降解 RNA 的作用和程度 (如降解 Degradation 或解離 Dissociation)；該方法的缺點是在層析過程中不能將其他高分子如 DNA、糖元等與 RNA 完全分開，而且 RNA 會全部分化丟失活性。

超聲波輻射對大分子核糖核酸的影響

蔡良琬 陳煜清 張福徽 梁植權

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

超聲波輻射對一般高聚化合物有聚合或解聚的不同作用^[1]。Laland 等^[2,3]在報告超聲波對脫氧核糖核酸(DNA)作用時,指出超聲波可使 DNA 發生降解,但多核苷酸間的氫鍵很少破壞。由於核糖核酸(RNA)具有和 DNA 不同的結構^[4-6],如單鏈組成,具有較短的螺旋區,以及柔韌性較大等特點。因此超聲波的沖擊對 RNA 會發生什麼樣的影響是值得探討的問題。本研究企圖通過超聲波對 RNA 的作用,再和它對 DNA 的比較,希望能對 RNA 的結構有所了解。

本文中採用大鼠肝核糖核朊粒 RNA 為材料,此 RNA 業經前人證明^[7],具有一般 RNA 的單鏈結構。

RNA 樣品的製備係採用改良的 Kirby 方法,以冷酚提取 RNA,然後用 1.2 M NaCl 沉澱。製品的 $\epsilon_{(p)} 258 \text{ m}\mu = 8160$ (樣品溶於 0.1 M 的 NaCl 中)。超聲波輻射是用捷克 Kovo 250 W 超聲波發生器。RNA 溶於 0.05 M pH 7.2 的磷酸緩衝液中,放在平底玻璃管內,以固定的輻射條件(輸出 195 瓦)進行處理。管壁厚 0.1 厘米。

我們計研究了超聲波處理對下列性質的影響:粘度,擴散係數,紫外吸收光譜,甲醛結合,鹼水解的高色性,對核糖核酸酶的敏感性,沉降行為等。此外還進行了超聲波處理後的 RNA 再經乙醇沉澱處理,粘度能否恢復的試驗。粘度測定係採用自製 Ubbelöhde 式粘度計。擴散係數測定採用 Antweiler 微量電泳儀,所有光密度的測定都應用 Unicam SP 500 分光光度計。

經過超聲波處理, RNA 的還原粘度下降,開始變化迅速,至 25 分鐘後粘度即下降很少或不再下降。下降最大幅度在 40% 左右。另外也看到 RNA 經 25 分鐘超聲波處理後,所表現的還原粘度對濃度的依賴性消失。RNA 經超聲波處理後粘度的下降,比 DNA 經相同劑量的超聲波處理後的粘度下降為少。

在其他分析中我們皆採用了固定超聲波條件,在同一輸出功率處理 25 分鐘。發現處理後的 RNA 擴散係數稍有增大,但並不很明顯。對核糖核酸酶的敏感性也稍有增加,但不顯著。測定甲醛結合反應時,採用了兩個溫度, 25° 及 45°C,並未發現有何變化。經超聲波處理後, RNA 的紫外吸收光譜未見改變,也沒有高色效應產生。應用鹼水解 RNA 所表現的高色性與正常的完全一致。應用乙醇沉澱經超聲波處理的 RNA,並測定其粘度,發現與沉澱前相比沒有什麼變化,並沒有粘度的恢復。

根據以上實驗結果,經超聲波處理後,大分子 RNA 的最顯著變化是粘度下降,這一點和 DNA 很相似,只是程度較小。這可能是由於 RNA 的柔韌性較大不易折斷之故。粘度對濃度依賴性的消失表示經超聲波處理後,分子的不對稱性明顯下降,說明 RNA 的柔韌性較大易於變形。紫外吸收光譜,鹼水解高色性,甲醛結合反應等,皆沒有明顯的變化,顯示氫鍵沒有受到明顯的影響。

應用醋酸鈾沉澱核酸的方法，並未發現經超聲波後有很小分子的核苷酸生成。由擴散係數及對核糖核酸酶敏感性雖有改變但改變不大看來，RNA 的降解可能只在很小的程度上生成較大的降解碎片。另外粘度下降的不可恢復性也說明 RNA 分子在經超聲波處理後，並不只有構型上的改變，而是由於發生降解所致。

為了更確定 RNA 經超聲波作用後發生的降解，我們正進行其沉降係數的測定及分子量的計算。

主要參考文獻

- [1] 克洛福德著：超聲工程，科學出版社，181—195頁，1959。
- [2] Laland S. G., Overend W. G., Stacey M.: J. Chem. Soc. p. 303 (1952).
- [3] Doty P., McGill B. B., Rice S. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. 44: 482 (1958).
- [4] Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Hasedkorn R. Litt M.: Proc. Nat. Acad. Sci. 45: 482 (1959).
- [5] Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P.: Nature. 188: 98 (1960).
- [6] Спирия А. С., Гаврилова Л. П., Известия А. Н.: Серия Биол. No. 4, стр. 504, (1961).
- [7] Hall B. D., Doty P.: J. Mol. Biol. 1: 111 (1959).

核酸鹼基組成分析方法的研究

III. 脫氧核糖核酸嘧啶和嘓啶衍生物直接 分光光度測定法

胡炳晟 劉承斌 吳 翬 梁植權

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系, 北京)

測定核酸鹼基組成對核酸的研究工作有重要意義。直接測定核酸組成含量的工作近年來已有很大發展。在一個多組分體系中，當已知各組分的吸收光譜並且它們具有綫性加合性質時，混合體系在一定波長的總光密度值將等於體系中各組分光密度值之和。本文根據此原理並利用了核鹼在不同 pH 條件下發生異構而在紫外區表現出不同的吸收性質的特點，提出了自水解液中直接測定脫氧核糖核酸核鹼 A, G, C, T 的簡易方法。

樣品在 100°C 和過氯酸 (11.5—12N) 作用 1 小時，水解液加水稀釋至 2.0N 過氯酸的濃度，旋離，取上清液兩等分，分別加入同體積的標準酸鹼溶液，以調正測定溶液相當於 0.10N HCl (pH 1) 和 0.10N NaOH (pH 13)。在波長 249, 262.5, 271 和 290 mμ 測定 pH 1 溶液的吸收值，在 258, 262, 282.5 和 290 mμ 測定 pH 13 溶液的吸收值，代入下列公式求解出樣品中 A, G, C, T 各核鹼的微克分子含量。

$$T = 0.231 \cdot \Delta D_{290,13} - 290,1 \cdot V$$

$$G = 0.192 \cdot \Delta D_{249,13} - 258,13 \cdot V - 0.325 T$$

$$C = 0.150 \cdot \Delta D_{271,13} - 262,13 \cdot V - 0.466 T$$

$$A = 0.105 \cdot \Delta D_{262.5,13} - 282.5,13 \cdot V - 0.317 T$$

AD 為光密度差, V 為測定溶液體積的毫升數。

由不同核鹼比例組成的混合體系的實驗表明, 當 $A+T/G+C$ 比值為 1.02, 1.18, 0.42 和 2.09 以及 A 與 T 和 G 與 C 相差較大時, 對測定靈敏度均無顯著影響, 回收率為: A , 98—99%; G , 94—99%; C , 95—99% 和 T , 97—106%。對同一樣品的測定應用本法和紙層析法做了比較, 兩者測定值相當接近。

本方法適用於含有 A, G, C, T 四種核鹼的提純脫氧核糖核酸樣品和低聚核苷酸主要核鹼的鑑定。測定中由於不需要分出步驟, 測定誤差可以相應減少。操作簡易, 一次樣品的測定可以在 2—3 小時內完成。但若樣品中含有其他新鹼基, 可能會構成光譜干擾。在降解條件方面應用本法則必須降解成自由鹼基。

電離輻射對大鼠肝 nRNA 代謝的影響

I. Co^{60} 外照射對大鼠肝 nRNA 含量的影響

楊澤田 李恆澤 王成濟 萬芷芳 陳蘇民 蘇成芝

(第四軍醫大學生化教研室, 西安)

關於射綫對動物組織中, 核酸代謝的影響, 一般認為 DNA 的合成受到明顯抑制, 而 RNA 則變化很小; 但這些結果多係就整個組織細胞而言, 我們知道 RNA 並非均一體, 而細胞核中的 RNA (nRNA) 雖然較細胞質中 RNA (cRNA) 為少, 但 nRNA 代謝速度遠較 cRNA 為快, 而且易受外界影響。最近 Welling 也指出 X 射綫對早期再生肝能引起 nRNA 轉換率的降低, 因此可以推想射綫除影響動物組織 DNA 的代謝外, 對於 nRNA 的代謝可能也有一定影響。為了進一步闡明這一問題, 我們觀察了大白鼠在接受 Co^{60} 外照射後肝中 nRNA 含量和代謝速度的變化。

實驗方法

試驗動物: 雄性大白鼠, 體重 200 ± 20 克, 按隨機配偶分組設計, 共分為實驗和飢餓對照兩組, 每組動物 7 只。

照射條件: Co^{60} 一次全身照射, 球死量 750 r, 劑量率 4500 r/分鐘。對照組同時進行假照射。

肝細胞核的分離: 係按 Philpot 法 (用甘油蔗糖為基質) 加以改進, 為了減少 nRNA-P 定量時的干擾, 將介質中磷酸甘油鉀省去, 並於勻漿後用雙層細呢過濾, 先除去組織塊和完整細胞, 然後在冰凍離心條件下, 首先用 1000 g 10 分鐘分離細胞核, 繼以 2240 g 10 分鐘反覆“分層”懸浮洗滌兩次, 最後用 0.25 M 蔗糖 (含 $CaCl_2$, 0.0018 M) 洗去介質中的甘油, 最後將核懸於 0.25 M 蔗糖 (含 $CaCl_2$, 0.0018 M) 中。顯微鏡下觀察完整細胞一般在 1% 以下, 琥珀酸脫氫酶活力測定證明細胞漿沾染極少。P³² 摻入試驗具代謝活性。細胞核計數按白血球計數法。

P³² 摻入試驗： 介質按 Rees (200 mM pH7.2 tris HCl 緩衝液, 750 mM KCl, 50 mM MgSO₄, 核懸液 1 ml。Na₂H P³² O₄ 20 μc) 37°C 保溫, 分別於 30、60、90 分鐘取樣, 按 ST 法分離 RNA, 用玻璃碟液體鋪樣計數。

確定樣： 採用 Youngburg 法加以改進, 硫酸消化後用鉬酸銨氯化亞錫呈色。

RNA 分離： 仍用 ST 法。

結 果

根據全身一次致死劑量照射後的大白鼠, 多在照射後第 8 天開始死亡, 因此我們在照射後第 8 天將動物殺死, 測定肝臟 nRNA 含量變化如下:

大鼠照射後肝 nRNA-P 含量的變化
μg × 10⁻⁶/核

| 鼠號 | 對 照 組 | 試 驗 組 | 差 數 × | 備 註 |
|----|-------|-------|-------|--|
| 1 | 2.440 | 0.615 | 1.825 | t = 3.2 df. 6 5%點為: 2.447 t > 5%點 相差顯著 |
| 2 | 1.550 | 0.610 | 0.940 | |
| 3 | 2.730 | 0.705 | 2.025 | |
| 4 | 1.040 | 0.440 | 0.600 | |
| 5 | 1.024 | 0.486 | 0.538 | |
| 6 | 0.631 | 0.598 | 0.033 | |
| 7 | 0.956 | 0.572 | 0.384 | |

從上列結果可以看出照射後大鼠肝 nRNA 含量較對照組有顯著降低。

用上述核懸液進行 P³² 摻入試驗, 也可看出試驗組較對照組摻入速度為低, 這與 nRNA-P 含量的減少完全一致, 不僅如此, 即使在照射後 36 小時, nRNA-P 量尚無明顯變化前, P³² 的摻入速度已有顯著降低, 這也說明 Co⁶⁰ 外照射對大鼠肝 nRNA 的合成有明顯的抑制。

主 要 參 考 文 獻

- [1] Rees: Biochem. J. (1961) 78: 89.
- [2] Welling: B. B. A. (1960) 42: 181.
- [3] Philpot: Biochem. J. (1956) 63: 214.
- [4] Davidson: The Nucleic Acid. I. II.

克山病的臨床酶學考察

(吉林醫科大學, 生化教研室)

(一) 血清銅氧化酶 (Ceruloplasmin)

劉瑞玲 楊同書 朱育惠

本文對 1961 年春在吉林省伊通縣營城鎮發生的 66 例克山病住院病人, 分成四組: 第 I 組: 急型病人 25 例; 第 II 組: 亞急型 21 例; 第 III 組: 癆型 9 例; 第 IV 組: 可疑病人 11 例 (這組病人經追蹤觀察, 在本文寫成後, 均已確診為克山病)。另外第 V 組: 健康對照組: 當地正常成人 16 名。按照 Houchin^[1] 方法檢查血清銅氧化酶活力的變動, 其結果如下:

| | 例次數 | 平均值 (單位) | 範圍 (單位) |
|---------|-----|----------|---------------------------------|
| 第 I 組 | 67 | 2.14 | 0.48—5.43 |
| 第 II 組 | 30 | 2.38 | 1.22—5.89 |
| 第 III 組 | 9 | 2.55 | 1.57—3.44 |
| 第 IV 組 | 11 | 2.41 | 1.57—4.38 |
| 第 V 組 | 16 | 2.02 | 1.22—2.52 (15 例) (另有一例 3.56) |

在上記無選擇抽樣測值的統計結果, 與第 V 組對比, 除第 III 組外都沒有顯著差異。這與病期參雜, 選樣不當, 測值分散有密切關係。如果在測定次數較多的第 I 組選擇每個病人多次測定中的最高值, 進行統計觀察, 其 25 例次測定平均值為 2.84 單位, 與第 V 組對比, 就有顯著差異, 可見血清中銅氧化酶測定的時機, 對於發現此酶活力的改變有重要的意義。

血清銅氧化酶——病日曲綫: 從 19 例測定次數較多, 病程進展比較單純的 I、II 組病人的測定結果, 按病日進行統計, 以病日作橫軸, 以酶活力作縱軸, 能作出一定型式的血清銅氧化酶活力——病日曲綫。其曲綫性質: 在第 2 病日有較明顯的下降, 第 3 病日開始上升, 第 5 病日達到最高峯, 以後則緩緩下降, 及至第 9—10 病日可恢復正常圍範, 這種曲綫除在上述的統計結果外, 在具體病人也被證實, 並進行了討論。

本文還對血清銅氧化酶的上升機制進行了討論。雖然目前對血清銅氧化酶的生理功用還不完全清楚 (Rice E. W.^[2], Scheinberg I. H.^[3]), 但本文所錄結果與 Vallee B. L.^[3], Sullivan J. F.^[4] 等在心肌梗死病人測錄的結果, 極為相似, 因此我們推想克山病急性發作時, 可能伴有心肌梗死樣改變。

參 考 文 獻

- [1] Houchin O. B.: Clinical Chem. 4 519 (1958).
- [2] Scheinberg I. H.: Federation Proc. 20 179 (1961).
- [3] Vallee B. L.: Metabolism. 1 420 (1952).
- [4] Sullivan J. F. et al: J. Lab. Clin. Med. 55 260 (1960).
- [5] Rice E. W.: Clinica Chemica Acta. 6 652 (1961).

(二) 血清谷草轉氨酶 (S.GOT)

趙嵐勤 楊同書 朱育惠

按 Frankel (1957), King^[1] 的改良方法對 66 例克山病人 [材料來源及分組參照摘要 (一)] 的 S.GOT 活力變動進行探討,其結果如下:

| | 例次數 | 平均值 (單位) | 範圍 (單位) |
|---------|-----|----------|---------|
| 第 I 組 | 60 | 286.4 | 54—1140 |
| 第 II 組 | 17 | 235.7 | 15—530 |
| 第 III 組 | 9 | 156.9 | 68—287 |
| 第 IV 組 | 10 | 122.5 | 48—200 |
| 第 V 組 | 16 | 52.5 | 15—82 |

上記無選擇抽樣,雖然測值相當分散,但因酶活力變動極大,經過統計學處理克山病人第 I, II, III, IV 與第 V 組比較,都有統計學的顯著差異。

S.GOT 活力最高的,在生存病人達 680 單位,為正常值的 10 數倍,在死亡病人達 1140 單位,為正常值的 20 倍以上。在第 I 組全部都觀察到 S.GOT 活力升高的結果。

S.GOT 活力——病日曲綫:選擇測定次數較多,病程進展比較單純的 22 例急型,亞急型病人,按不同病日測值和病日繪成。

S.GOT 活力病日曲綫:其性質,從發病開始, S.GOT 活力急劇上升, 2—3 病日達到曲綫最高峯,其後則急劇下降,第 5—6 病日已基本接近正常範圍。

為進一步證實上述規律,從 13 例急型病人測值作曲綫最高峯出現日期的統計時,平均值為 2.2 病日。此時各病人的 S.GOT 最高值平均值為 417.5 單位。與前述規律完全符合,只是曲綫上升更快,上升程度更高。此外在具體病人,這一規律也被證實。

以上結果與心肌梗死病例報告文獻 (Wrohlewski F.^[2], Agress C. M.^[4,5]) 的 S.GOT 活力變動形式,極相類似。再結合本文其他有關檢查,認為克山病的 S.GOT 活力變動能夠正確的反映出心肌損傷的存在及其程度,確是一個靈敏的早期診斷或病程判定的指標。

參 考 文 獻

- [1] King J.: J. Med. Lab. Technol. 17 1 (1960).
- [2] Wrohlewski F.: Am. J. Med. 27 911 (1959).
- [3] Wrohlewski F.: Advances Chin. Chem. 1 314 (1958).
- [4] Agress C. M.: Am. J. Caroiol. 3 74 (1959).
- [5] Agress C. M. et al: Ibid. 6 641 (1960).

(三) 血清醛縮酶 (S. Ald)

毛運宜 楊同書 朱育惠

應用 Товарницкий 方法的改良法^[1] 探討 66 例克山病人 [材料及分組參照摘要 (一)] 的血清醛縮酶活力的變動, 結果如下:

| | 例次數 | 平均值 (單位) | 範圍 (單位) |
|---------|-----|----------|------------|
| 第 I 組 | 62 | 17.0 | 1.32—125.6 |
| 第 II 組 | 18 | 12.6 | 1.32—58.5 |
| 第 III 組 | 10 | 6.3 | 0.6—16.1 |
| 第 IV 組 | 9 | 19.3 | 11.1—33.2 |
| 第 V 組 | 7 | 9.9 | 7.06—13.1 |

這些病人 S. Ald 活力最高的, 在生存病人達 58.5 單位, 死亡病人達 125.6 單位, 分別為正常值的 5—10 數倍。但是在無選擇抽樣測值統計的結果, 與第 V 組對比, 只 III, IV 兩組有顯著差異, I, II 兩組因為測定次數多, 病期參雜, 測值分散而沒有顯著差異, 如果從第 I 組選擇每個病人多次測值中的最高值, 進行統計處理, 其 25 例次的平均值為 31.9 單位, 與第 V 組相比較, 就有顯著的差異。因而, 在心肌梗死病人, 未能確證 S. Ald 意義的文獻 (White L. P.^[2], West M.^[3] 等) 如能注意選樣時機, 對於發現 S. Ald 活力的變動, 是有幫助的。

S. Ald 活力——病日曲綫 [作注參照摘要 (一)]: 從 20 例病人的測值得出一定型式的曲綫。其性質: S. Ald 活力, 從發病開始上升, 比 S. GOT 稍緩慢, 第 3 病日達到曲綫最高峯, 其後開始下降, 到第 8—9 病日才接近正常範圍。在具體病人也可以得到同樣規律。

以上結果, 與 Volk B. W.^[4], Petersen V. P.^[5], Лукомский П. Е.^[6] 所觀察心肌梗死病人的結果, 極相類似。結合本摘要另有報導, 我們認為 S. Ald 活力變動情況能够作為克山病人心肌損傷的一個有力指標。

參 考 文 獻

- [1] Товарницкий идруг: Лабораторное дело. (6), 6 (1955).
- [2] White L. P.: New Engl Med. J. 255 984 (1956).
- [3] West M. et al: Am J. Med. Sci. 241 350 (1961).
- [4] Volk B. W.: Ibid. 232 38 (1956).
- [5] Petersen V. P.: Acta Med. Scand. 164 131 (1959).
- [6] Лукомский П. Е.: Кардиология. (3) 3 (1962).

(四) 血液碳酸酐酶

張行海 楊同書 朱育惠

應用我們對 Philpot E. J. 方法的改良法^[1] (待發表資料) 觀察 23 例克山病人血液碳酸酐酶 (C. A.) 活力的變動, 其結果如下:

| | 例次數 | 平均值 (單位) | 範圍 (單位) |
|---------|-----|----------|----------------|
| 第 I 組 | 22 | 2.04 | 1.55—4.38 |
| 第 II 組 | 8 | 2.54 | 1.63—3.52 |
| 第 III 組 | 5 | 5.25 | 3.53—6.77 |
| 第 IV 組 | 1 | 3.55 | — |
| 第 V 組 | 12 | 4.71 | 3.2—6.0 (11 例) |

(另例為 2.42)

在急型亞急型病人的急性發作時期, C. A. 活力都處於高度抑制狀態, 最低達 1.55 單位, 為正常值的 1/3 左右, 但癆型病人 C. A. 活力有上升的趨勢。上記無選擇抽樣測值的統計結果, 與第 V 組比較, 第 I, II, III 組都有顯著差異, 這與 C. A. 活力恢復較慢, 容易被觀察到有一定關係。

這些結果, 如按病期進行分析, 並結合具體病人, 可以看到 C. A. 活力在發病後不久, 就開始下降, 其後延續相當長的時間。有的病人其他酶活力, 已經全部恢復, 而 C. A. 活力仍然保持在一定低值。這是 C. A. 活力與其他酶活力變動的顯著不同之點。

C. A. 在紅細胞中含量為實際需用酶量的數十倍, 所以直到目前為止的文獻中, 尚未見到 C. A. 活力下降的醫學報導, Kpenc E. M.^[2] 曾報告敗血症垂危之前 C. A. 活力降低, 但如以 C. A. 活力/紅細胞數比值計算時, 並不減少, 而不是 C. A. 活力的真正下降。本文報告的資料, 如以 C. A. 活力/血紅蛋白量。C. A. 活力/紅細胞數比值計算時, C. A. 活力也仍然遠離正常水平, 可見克山病人, 急性發作時 C. A. 活力的下降, 確是 C. A. 活力的真正降低。癆型病人的 C. A. 活力上升與慢性心肺疾病病人的 C. A. 活力變動 (Adams F. H. 等^[3] Shepard T. H.^[4] 有相似之處。

我們認為克山病的急性發作時, 血液 C. A. 活力的下降及其恢復的緩慢, 對於克山病的急型發作機制, 似有特殊意義。(楊同書^[5])

參 考 文 獻

- [1] Philpot E. J.: *Biochem. J.* **30** 2191 (1936).
- [2] Kpenc E. M.: *Хирургия.* **15** (5) 22 (1945).
- [3] Adams F. H. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.* **73** 642 (1950).
- [4] Shepard T. H.: *Am. J. Med. Sci.* **233** 162 (1957).
- [5] 楊同書: 北方七省克山病病因探討座談會報告 (1961).

(五) 克山病的血液酶譜 (Enzymogram)

楊同書 朱育惠

本文根據 66 例克山病人的 S. GOT, S. GPT, S. Ald, 血清胆鹼酯酶, 血清銅氧化酶, 血液碳酸酐酶, 血液谷胱甘肽等七種酶的活力變動, 找出了克山病人血液酶譜的特徵, 並對其實用意義, 進行了討論。

上述七種酶, 在克山病急性發作時, 可以看到三種類型的變動規律:

- (1) S. GOT, S. GPT, S. Ald 活力上升, 與臨床所見的程度, 常呈平行的增長關係。
- (2) 血清銅氧化酶, 血清胆鹼酯酶有其獨特的變化規律, 已如前述, 尤以兩個酶的活力——病日曲綫, 恰成鏡像關係, 值得注意。
- (3) 血液碳酸酐酶活力呈高度抑制狀態, 恢復緩慢, 是克山病血液酶譜的最大特點。血液谷胱甘肽含量在具體病人, 有下降傾向。

根據血液各種酶活力的變動的特別規律性, 變動時期不同, 在克山病的病程中, 其一般規律是: 在發病開始時, S. GOT 活力最先上升, S. GPT, S. Ald 次之。血清胆鹼酯酶有輕度上升傾向, 血清銅氧化酶有下降的趨勢。隨着病情好轉, S. GOT 活力急劇下降, S. GPT, S. Ald 活力也相繼下降, 當 S. GOT 活力下降到正常範圍以前, 血清銅氧化酶活力已開始緩慢上升。血清胆鹼酯酶活力開始下降。在 S. GPT, S. Ald 等酶活力下降接近正常範圍時, 血清銅氧化酶活力也越過最高點開始下降, 血清胆鹼酯酶活力也越過最低點而開始回升, 其後則血清胆鹼酯酶, 血清銅氧化酶逐漸恢復正常。

但在遷延病人, 各種酶活力都有相應的波動性, 死亡病人, 則直到死亡前 S. GOT, S. GPT, S. Ald 等, 常呈直綫上升。

因此, 我們認為利用克山病的血液酶譜分析, 對於臨床診斷, 病情, 病程, 予後的估計, 進行綜合判定, 具有特殊意義。這與最近文獻報告的綜合判定傾向是一致的。(Hamalsky M. W.^[1], Hargreaves T.^[2], Торжеску В.^[3], Луканский^[3])。

參 考 文 獻

- [1] Hargreaves T: J. Clin. Pathol. 14 233 (1961).
- [2] Торжеску В.: Вопр. Мед. Химии 8 27 (1962).
- [3] Луканский П. Е.: Кардиология. (3) 3 (1962).
- [4] Hamalsky M. W.: Circulation. 23 102 (1961).

(六) 血液酶譜變動的機制

楊同書 朱育惠

根據 66 例克山病人血液酶學的變動與臨床症狀，病理解剖，肝臟功能，心電圖，組織酶學等檢查的關係，對克山病人血液酶譜變動的機制，進行如下探討：

血液酶譜的變動與臨床症狀具有平行關係，典型病人呈現典型的血液酶譜，遷延病人有相應的波動。本文就具體病人作了詳細討論。在予後方面，按文獻報告，S. GOT 活力上升過高的病人予後不良。這組病人中，在死亡病人其 S. GOT 活力相當高，但是 S. GOT 活力 300 單位以上的病人，與文獻報告的心肌梗死病人相比較，死亡率很低，值得注意。

血液酶譜的變動與病理解剖所見的關係：5 例死亡病人，在死亡前都有 S. GOT, S. Ald 活力的明顯上升。S. GOT 範圍為 304—1140 單位，有 3 例超過 800 單位；S. Ald 範圍為 24.1—125.6 單位，有 3 例超過 70 單位。這些酶活力上升的高度與死後心臟的典型克山病病理組織學所見，呈現明顯的平行關係。

除掉心臟病變以外，各例肝臟都有不同程度的壞死或脂變等病理變化，以 S. GOT, S. Ald 活力高度上升的病人為甚，與 Killip T.^[3] 等的報告，有相似之處。

血液酶譜的變動與肝臟功能的關係：在 S. GOT 活力上升的 20 例病人，檢查了硫酸銨濁度，麝香草酚濁度試驗，碘反應，血漿總蛋白量等項肝臟功能，但沒有得出肯定性的結論。這點與急性克山病人的 S. GOT/S. GPT 比值 >1 的結果，似乎都說明克山病人的肝臟改變不如心臟明顯。

血液酶譜的變動與心電圖的關係：對 9 例 S. GOT 活力上升 (122—525 單位) 的病人，同時檢查其心電圖的結果，有 7 例為異常心電圖，2 例為大致正常心電圖，酶學變動與心電圖間的檢查結果基本一致。可見 S. GOT 等活力的變動，是特別值得重視的，(Тлушинский^[4])。

血液酶譜的變動與組織酶學檢查：對 3 例克山病屍體，1 例自然死亡屍體的心臟及肝臟進行組織酶學測定的結果，在克山病屍體心臟 (左心，右心) 組織中 GOT, Ald 活力都低於對照例，但肝臟組織 GOT, Ald 活力沒有明顯差別。克山病屍體心臟組織 GOT, Ald 活力下降與死亡前 S. GOT, S. Ald 活力上升之間呈現了逆相關係，對於了解血液酶譜的變動機制，提供了一些綫索。

根據以上各點，對於克山病血液酶譜變動機制，進行了討論。

參 考 文 獻

- [1] Newrann M. J. et al: Lancet. 2 1187 (1958).
- [2] Wroblewski F.: Am. Heart J. 59 219 (1957).
- [3] Killip T. et al: Circulation. 21 646 (1960).
- [4] Трушинский: Клин Мед. (3) 119 (1961).
- [5] Agress C. M.: Am. J. Cardiol. 3 74 (1959).
- [6] Agress C. M. et al: Ibid. 6 641 (1960).

抗腫瘤藥對核酸代謝的影響

I. *N*-甲酰溶肉瘤素、谷氨酰溶肉瘤素對動物移植性腫瘤及正常組織中核酸的含量的影響

王振綱 籍秀娟 韓 銳 范禮理

(中國醫學科學院藥物研究所藥理學系,北京)

N-甲酰溶肉瘤素 (*N*-formyl-sarcosine, 簡稱 *N*-甲) 及谷氨酰溶肉瘤素 (*N*-phthalylglutamyl-sarcosine, 簡稱 PGS) 不僅對某些動物移植性腫瘤有明顯抑制作用, 而且在臨床上也表現了肯定的治療效果。為了研究其作用機制, 作者觀察了此二藥對動物移植性腫瘤及正常組織中核酸含量的影響。

實驗動物為小鼠及大鼠, 每組動物 5—10 只。移植性腫瘤包括艾氏腹水癌(腹水型及實體型) 網織細胞肉瘤 L₂, 肉瘤 180 及吉田腹水肉瘤等。核酸含量測定方法按 Schneider 修正 Schmidt 及 Thannhauser 氏法, 同時並與分光光度計法進行比較。

實驗結果表明: 正常小鼠每日口服 *N*-甲 (50 毫克/公斤) 連續 5 日, RNA 及 DNA 含量均較對照組有明顯降低; *N*-甲在同樣劑量下對腫瘤動物 (如艾氏癌, 網織細胞肉瘤 L₂ 等) 的脾臟 RNA、DNA 及腫瘤組織(細胞) 的 DNA 含量均有明顯的降低作用, 但對 RNA 的影響却不明顯。

不同劑量的 PGS (30, 50, 200 毫克/公斤) 每日一次, 連續 4—12 天, 對肉瘤 180 及網織細胞肉瘤 L₂ DNA 含量均有明顯降低作用。

從上述實驗結果看來, 在治療劑量下此二藥均能降低腫瘤組織中 DNA 的含量, 此作用可能與抗腫瘤作用有一定的關係。

抗腫瘤藥對核酸代謝的影響

II. *N*-甲酰溶肉瘤素、谷氨酰溶肉瘤素對 P³² 參入動物移植性腫瘤及正常組織核酸的影響

籍秀娟 王振綱 韓 銳

(中國醫學科學院藥物研究所藥理學系,北京)

作者前已證明 *N*-甲酰溶肉瘤素 (*N*-甲), 及谷氨酰溶肉瘤素 (PGS) 對動物移植性腫瘤及正常組織核酸, 特別是 DNA 的含量有明顯降低作用。為了進一步研究 *N*-甲及 PGS 對核酸生物合成的影響, 又觀察了對 P³² 參入腫瘤及正常組織核酸的影響。

實驗結果表明,正常大鼠每日口服 *N*-甲 80 毫克/公斤,或 PGS 30 毫克/公斤連續 5 天後,發現給藥組大鼠 P^{32} 參入脾臟 RNA 及 DNA 明顯受到抑制。給已接種艾氏癌腹水型及網織細胞肉瘤 L_2 的小鼠,口服 *N*-甲 80 毫克/公斤或 PGS 30 毫克/公斤連續 5 天後,給藥組 P^{32} 參入脾臟 RNA 及 DNA 與對照組比較均顯著受到抑制。於接種艾氏癌(腹水及實體型)、網織細胞肉瘤 L_2 及吉田腹水肉瘤後不同日期給動物口服 *N*-甲 50, 80 毫克/公斤,或 PGS 30 毫克/公斤連續 2—7 天,*N*-甲及 PGS 對 P^{32} 參入上述各種腫瘤組織的 RNA 均無明顯抑制作用。*N*-甲對 P^{32} 參入艾氏癌實體型及網織細胞肉瘤 L_2 的 DNA 無抑制作用。但 *N*-甲及 PGS 對 P^{32} 參入其他幾種腫瘤的 DNA 均有不同程度的抑制作用。

在部分實驗中曾觀察了溶肉瘤素(5—10 毫克/公斤)對 P^{32} 參入正常及腫瘤組織核酸的影響,所得結果與 *N*-甲及 PGS 基本相似。

根據以上實驗,說明治療劑量的 *N*-甲及 PGS 對 P^{32} 參入正常及腫瘤組織核酸有明顯抑制作用,其中以對 DNA 的作用為最明顯。上述結果與 *N*-甲及 PGS 對核酸含量的降低作用基本相符。

食管癌病人血尿若干生化值的分析

苗 健 陳本懋 關 力 油書恆 邱蘇吾 楊雲虹

(河南醫學院生化教研組)

禁食或飢餓時,人體的代謝與正常不同^[1],亦有報告某些癌腫可引起尿硫分配的改變^[2],而食管癌病人既有腫瘤的特點又有吞嚥困難,處於半飢餓狀態,特別是蛋白質缺乏引起機體的代謝改變,可能在血尿成分上有所反映,因而分析了 60 例確診的食管癌病人的血液及尿液的若干成分,並與有關正常值作了對照,為臨床治療及護理提供參考。

臨 床 材 料

河南腫瘤醫院,住院的食管癌病人,血液空腹靜脈取血,取用 24 小時尿樣的一部分做實驗。

結 果 及 討 論

由表 I 可以看出食管癌病人血液磷酸酶、澱粉酶、過氧化氫酶活性均在正常範圍,但 60 例病人血清中全有酸性磷酸酶活性,最低限也是 4.03 單位;澱粉酶活性的平均值在正常範圍的最高限;過氧化氫酶活性 4.77 單位却在正常範圍的最低限;而血糖低於正常值。已知前列腺癌引起酸性磷酸酶活性升高,而一般癌腫又常引起肝過氧化氫酶活性降低,從本文測定結果酶活性改變的趨勢看來,似與食管癌是有關的。

表 I 血 液

| 項 目 | 標本 | 測 定 值 | 正 常 值* | 方 法 |
|-------|----|------------------------|----------------------------|--|
| 鹼性磷酸酶 | 血清 | 3.30—12.71 (7.13) | 4.5—9.5 (7.0) | King-Armstrong 氏法 ^[3] |
| 酸性磷酸酶 | 血清 | 4.03—5.92 (4.90) | 0—5.0 | King-Armstrong 氏法 ^[3] |
| 澱 粉 酶 | 血清 | 68.7—250.0 (159.0) | 60—160 | W. T. Caraway 氏法 ^[4] |
| 過氧化氫酶 | 全血 | 3.39—5.60 (男)(4.77) | (男) 4.5—6.5 (女) 3.5—5.5 | KMnO ₄ 滴定法 ^[5] |
| 還 原 糖 | 全血 | 48.5—64.0 (56.1) | 70—110 | Shaffer-Hartman-Somogyi 滴定法 ^[6] |

* 正常值見所載方法的文獻,未另行測定。

表 II 尿 液 (克/24 小時)

| 尿 成 分 | 測 定 值 ⁺ | 總 N 或總硫 的百分數 | 正 常 值* | 總 N 或總硫 的百分數 | 方 法 |
|-------------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|--|
| 總 N | 1.86—7.94 (4.73) | 100 | 8.19—10.4 (9.30) | 100 | Folin-Farmer 氏比色 法 ^[1] |
| 氨 N | 0.18—0.51 (0.24) | 5.07 | 0.33—1.10 (0.71) | 7.64 | Folin-Bell 氏置換法 ^[1] |
| 氨基-N | 0.06—0.24 (0.20) | 4.23 | 0.2—0.33 (0.26) | 2.80 | Henriques-Sørensen 甲醛滴定法 ^[2] |
| 尿 酸 | 0.14—0.80 0.48 (0.16 克 N) | 3.4 | 0.6—0.9 0.75 (0.25 克 N) | 2.69 | Benedict-Franke 氏 法 ^[1] |
| 肌 酐 | 0.32—1.71 1.02 (0.4 克 N) | 8.4 | 1.0—2.32 1.34 (0.5 克 N) | 5.4 | Folin 氏法 ^[1] |
| 肌 酸 (88%病人) | 0.014—0.093 0.041 | — | 0—0.073 (0.017) | — | Folin 氏法 ^[1] |
| 總 硫 量 (按 S 計克) | 0.635 | 100 | 1.03 | 100 | Fiske 氏修改的 Rose- heinand-Drummond 二氏法 ^[1] |
| 脂 態 硫 | 0.075 | 12.4 | 1.10 | 9.30 | |
| 無 機 硫 | 0.453 | 71.3 | 0.82 | 80 | |
| 中 性 硫 | 0.106 | 16.3 | 0.11 | 10.7 | |
| N : S | 4.5:1 | — | 9:1 | — | |
| 黑尿酸病人 | 74.3% 病人有此酸 | — | — | — | 鹼 試 法 |

+ 共測定 60 例。

* 共測定 12 例。

從表 II 可見正常人排 N 量為 9.30 克,其氨-N 為 7.64%,氨基-N 為 2.8%,尿酸-N 為 2.7%,肌酐-N 為 5.4%;但食管癌病人尿總氮為 4.73 克,其中氨氮為 5.07%,無論測定的絕對值或佔總 N 的百分數均降低,氨基氮佔總 N 的百分數則升高,並且 74.3%病人尿中有黑尿酸,與 Kaplansky^[8] 曾報告蛋白質缺乏所引起某些氨基酸代謝(脫氨基作用及轉氨基作用)的紊亂有相似之處。就從尿硫測定結果看,雖然患者尿中總硫量降低,其酯

態硫及中性硫佔總硫量的百分數却有增加，氮與硫的比率降低（患者 4.5，正常 9.0），與 Papadopoulou^[7] 曾報告的肺癌胃癌及喉癌患者尿氮與尿硫變化結果一致，可能是細胞內含硫氨基酸與其他含 SH 基化合物氧化率有改變之故。同時 88% 病人出現肌酸尿，也是氮代謝紊亂的表現。從以上事實看來食管癌病人腫瘤組織本身以及進食困難，缺乏蛋白質是引起代謝紊亂的兩個原因，因此治療及護理必須注意補充蛋白質以增強對疾病的抵抗力。

表 III 血清還原力試驗

根據 Н. А. Коновахова 氏^[6] 報告方法：用一定量的血清，還原一定量甲烯藍的時間為指標測定結果。

| | 例數 | 陽性數 | 陽性率 (%) |
|-------|----|-----|---------|
| 食管癌病人 | 60 | 48 | 80 |
| 宮頸癌病人 | 16 | 15 | 93 |
| 非腫瘤病人 | 60 | 0 | 0 |
| 克汀病人 | 7 | 7 | 100 |

表 III 說明患者（食道癌、宮頸癌、克汀病人）血清還原力與正常人及非腫瘤病人不同，為了解這一變化的本質亦作了些探討，用維生素丙及雞蛋清在同樣條件下固可還原甲烯藍使之退色，所需時間長；但一毫升血清中維生素丙含量不足 10 微克、谷胱甘肽、半胱氨酸含量也少，恐非引起退色的主要因素。根據^[9] 腫瘤組織還原力增加，含的 SH 基比正常組織為多，腫瘤病人血清中 SH 基減少，因而推測引起退色的原因可能是血清中具有 SH 基的化合物，如蛋白質分子中含有 SH 基，血清中還原力的大小與血清中蛋白質分子中 SH 基的多少和蛋白質含量有關^[9]，至於克汀病人何以血清還原力亦比正常人低，因缺乏小孩血清還原力的材料尚不能作何推測。

（本文承郭成才副教授及藥理教研組馬統助講師審閱，郭培芝技士及生化進修生參加技術工作，一併致謝）。

參 考 文 獻

- [1] P. B. Hawk: Practical physiological chemistry 1954 Thirteenth Edition, p. 1058, 571, 876, 890, 897, 905, 899—903, 949—950.
- [2] H. G. Crabtree: Cancer Research, 1946, 6, 554.
- [3] E. J. King; I. D. P. Wootton: Micro-Analysis in Medical Biochemistry, 1956, 3rd ed. London.
- [4] W. T. Saraway: Am. J. Clin. Path., 1959, 23, 97.
- [5] 郭成才等: 中華醫學雜誌, 1955, 3, 233 頁。
- [6] Н. А. Коновахова: Лабораторное Дело., 1959, 4, 27.
- [7] Daphne, B. Papadopoulou: Clin. Chem., 1957, 3, 257.
- [8] С. Я. Капланский: Вопросы Медицинской Химии, 1957, 3, 340.
- [9] J. P. Greestein: Biochemistry of Cancer, 1954, 2nd ed. p. 555.

家蠶和野蠶的轉氨酶及酰胺酶的比較研究 以及蓖麻蠶絲腺體支鏈氨基酸-谷氨酸 轉氨酶和天門冬酰胺酶的提取及其性質

許延森 劉靜如 唐梓進

(南京師範學院化學系)

酶促轉氨作用在氨基酸的中間代謝及生物合成蛋白質等方面起着重要作用。此外，谷氨酰胺及天門冬酰胺在運輸和儲藏氮以及合成氨基酸等方面之作用亦頗為顯要。

蠶的氨基酸代謝研究之一個重要方面是緊密和蠶絲蛋白質的合成相聯系。桑葉中蛋白質和游離氨基酸和蠶絲蛋白質之差別甚為顯著。Fukuda 等發現甘氨酸及絲氨酸等可直接形成蠶絲蛋白質。由於蠶絲蛋白質之主要成分為甘氨酸、丙氨酸及絲氨酸；因此，丙氨酸之形成機制值得深入研究。Koide 及作者曾對家蠶一些重要轉氨酶進行測定，發現五齡四日左右絲腺體中活力最高，而此時期蠶絲蛋白質之形成也最為旺盛，這說明轉氨作用和蠶絲蛋白質形成之緊密關係。本文比較家蠶和野蠶各種氨基酸和 α -酮戊二酸之轉氨作用，並闡明丙氨酸之形成機制。在家蠶和野蠶之絲腺體及脂肪體中，都具有活力強的谷丙和谷天轉氨酶，野蠶絲腺體尚具有支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶。此外，蓖麻蠶絲腺體存在活力甚強的天門冬酰胺酶。作者對後兩酶進行了提取，並研究其性質。

1. 家蠶和野蠶各種不同氨基酸和 α -酮戊二酸之轉氨作用：家蠶和野蠶絲腺體後部和脂肪體各種氨基酸和 α -酮戊二酸之間的轉氨作用列於表 1。

由表 1 可見，家蠶和野蠶絲腺體後部都具有活力強的谷丙及谷天轉氨酶。因此，絲腺體中丙氨酸之合成機制，可通過不同途徑（如通過谷天轉氨酶及 α -酮戊二酸在谷氨酸脫氫酶作用下之加氮作用等）形成谷氨酸，繼而在谷丙轉氨酶之作用下，形成丙氨酸。Flor-kin 等利用 C^{14} -丙酮酸，證明可以合成 C^{14} -丙氨酸。此外，桑葉中含大量的谷氨酸和天門冬氨酸，它們在谷丙及谷天轉氨酶之作用下，乃是合成丙氨酸的重要來源。

各種氨基酸對 α -酮戊二酸之轉氨作用，在家蠶和野蠶之比較研究中，差異最為顯著的是支鏈氨基酸。被研究的野蠶絲腺體都具有該轉氨酶活力，而家蠶絲腺體中則無（表 1）。這可能由於外界環境之差異及形成絲蛋白質之不同，而反映在家蠶和野蠶之氨基酸代謝的酶系統上。丙氨酸、天門冬氨酸及支鏈氨基酸之轉氨作用有可能通過間接的途徑，即先經脫 α -氨基作用，繼而和 α -酮戊二酸進行加氮作用而成。作者用提取的酶制劑，證實了不存在以上脫氮及加氮作用，以上反應是酶促轉氨作用。

鑒於野蠶絲腺體具有支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶，其在野蠶氨基酸代謝中，可能佔有重要地位。我們利用家蠶和蓖麻蠶絲腺體，以各種支鏈氨基酸和丙酮酸進行轉氨作用；發現家蠶絲腺體支鏈氨基酸之轉氨作用活力甚小，而蓖麻蠶絲腺體之活力甚強。因此，在蓖麻蠶絲腺體中，可能存在支鏈氨基酸-丙氨酸轉氨酶，但也不排斥另一可能，即支鏈氨基酸之 α -氨基並非直接轉於丙酮酸，而是有 α -酮戊二酸之存在及在谷丙和支鏈氨基酸轉氨酶

之作用下,間接形成丙氨酸。由此,支鏈氨基酸不論通過直接或間接途徑是合成野蠶絲腺體之丙氨酸的另一來源。

表1 家蠶和野蠶絲腺體後部中各種氨基酸和 α -酮戊二酸之間的轉氨作用之比較*

| 氨基酸 | 野 蠶 | | | |
|-----------------------------|------|-------|------|------|
| | 家 蠶 | 蓖 麻 蠶 | 柞 蠶 | 樟 蠶 |
| 1克新鮮組織形成的谷氨酸量 (μ mole) | | | | |
| L-胱氨酸 | 0 | 0 | 1.8 | 4.3 |
| L-賴氨酸 | 0 | 0 | 4.0 | 9.2 |
| L-精氨酸 | 3.0 | 2.2 | 0.4 | 5.2 |
| L-色氨酸 | 0 | 1.7 | 2.0 | 6.1 |
| L-苯丙氨酸 | 0 | 0 | 1.0 | 2.1 |
| DL-亮氨酸 | 0 | 45.3 | 26.3 | 44.6 |
| DL-異亮氨酸 | 0 | 50.5 | 15.2 | 23.7 |
| L-組氨酸** | 0 | 0 | 0 | ? |
| L-酪氨酸 | 0 | 0 | 0 | 7.9 |
| DL-纈氨酸 | 2.1 | 36.7 | 17.7 | 23.5 |
| L-蛋氨酸 | 0 | ? | 0 | 0 |
| L-天門冬氨酸 | 36.6 | 84.5 | 44.5 | 37.4 |
| DL-絲氨酸 | 0 | 4.5 | 0 | 5.5 |
| L-甘氨酸 | 0 | 3.8 | ? | 6.7 |
| DL-丙氨酸 | 36.6 | 86.6 | 56.5 | 46.5 |
| L-脯氨酸 | 1.7 | 3.8 | 0.8 | 1.2 |

* 以上所形成之谷氨酸量已減去空白管(酶溶液+ α -酮戊二酸)所形成之谷氨酸量。

** 用 10^{-4} M EDTA 作為組氨酸脫氨酶之抑制劑。

酶溶液之製備——新鮮組織: 0.15 M KCl (1:6) 勻漿, 離心後之上清液。

反應條件——總體積為 0.8 毫升, 酶溶液 0.4 毫升, α -酮戊二酸及氨基酸各為 0.2 毫升(含 14μ mole), 若 DL-氨基酸則為 28μ mole。氨基酸及 α -酮戊二酸均溶於 0.05 M 碳酸緩衝液中, 最終 pH 為 7.4, 37 度, 保溫 1 小時。

家蠶和野蠶脂肪體中, 主要存在谷丙和谷天轉氨酶, 其他轉氨作用之活力均較低。

與 Koide 之結果相反, 我們發現在家蠶、蓖麻蠶及柞蠶體液中, 都存在谷天轉氨酶, 而柞蠶體液尚具有谷丙轉氨酶。同時, 比較了五齡蓖麻蠶不同日子谷丙及谷天轉氨酶(體液)及支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶(絲腺體)之活力。隨着五齡日子增長, 這些酶的活力顯著下降, 另外游離氨基酸之含量也平行下降, 由此可見, 這些酶系統的活力是和蠶絲蛋白質的形成相平行的。

蠶絲腺體是否存在丙天轉氨酶的問題尚未解決。我們利用 DL-環絲氨酸 (10^{-4} M), 谷丙轉氨酶抑制 99%, 而谷天轉氨酶抑制甚小。同時, 天門冬氨酸和丙酮酸之轉氨作用也幾乎全被抑制。該結果似乎是支持家蠶絲腺體之天門冬氨酸和丙酮酸之間的轉氨反應是谷丙及谷天轉氨酶聯合作用之結果。

2. 家蠶和野蠶谷氨酰胺酶及天門冬酰胺酶: 桑葉中含大量谷氨酰胺及天門冬酰胺, 這些酰胺一方面可通過轉氨酶之作用, 形成各種氨基酸, 同時, 又可在酰胺酶作用下, 形成其相應的二羧酸而參加以上所述之代謝。在家蠶和野蠶絲腺體等組織中, 較普遍地存在以上兩酰胺酶, 其中以蓖麻蠶絲腺體之天門冬酰胺酶的活力為最強。

3. 自蓖麻蠶絲腺體提取支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶及天門冬酰胺酶:

(一) 支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶之提取 取約 30 克五齡二日蓖麻蠶絲腺體後部, 加入 4 倍 0.15 M 氯化鉀溶液, 用搗碎機制成勻漿。離心 (4,000 轉/分, 4 度) 30 分鐘。上清液對水透析過夜。加入固體硫酸銨, 取飽和度為 0.35—0.65 之沉澱, 溶於水並透析。

酶反應條件: 總體積為 2 毫升, 含 0.5 毫升 α -酮戊二酸 (20 μ mole), 0.5 毫升 DL-異亮氨酸 (60 μ mole), 均溶於 pH 7.4 0.05 M 之鹼酸緩衝液中, 1 毫升酶溶液。37 度, 保溫 1 小時。用低層析定量測定酶作用形成之谷氨酸量。

(二) 天門冬酰胺酶之提取 取約 20 克蓖麻蠶絲腺體後部, 加入 4 倍 0.15 M pH 8.0 氯化鉀溶液, 搗碎機制成勻漿後, 離心 1 小時 (5,000 轉/分, 4 度), 沉澱含大部分天門冬酰胺酶。將沉澱溶於 0.02 M pH 8.0 硼酸鈉緩衝液中, 在玻璃勻漿器中製成勻漿, 離心以去除上清液。再將沉澱懸浮於以上緩衝液中, 製成勻漿, 並和磷酸鈣凝膠等體積混合, 大部分天門冬酰胺酶不被吸附。在提取之天門冬酰胺酶製品中, 不含谷氨酰胺酶、谷丙及谷天轉氨酶。

酶活力的測定: 同 Meister, 形成氨依 Speck 方法, 並用紙層析法測定天門冬氨酸量。

4. 蓖麻蠶絲腺體支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶及天門冬酰胺酶之性質:

(一) 底物濃度和反應速度之關係 在提取之轉氨酶作用下, 體積為 2 毫升; 其中酶溶液 1 毫升, 以不同濃度 DL-異亮氨酸 (0.5 毫升) 作為 α -氨基給體, α -酮戊二酸 (0.5 毫升) 20 μ mole (反應條件同上)。結果表明, 谷氨酸形成量隨 DL-異亮氨酸濃度增加而上升, 至 DL-異亮氨酸為 60 μ mole 為止。取 DL-異亮氨酸 60 μ mole (0.5 毫升), 而改變 α -酮戊二酸之濃度; 在 20 μ mole 以下時, 反應速度隨濃度增加而上升, 若大於 20 μ mole, 反應速度反而下降。在提取之天門冬酰胺酶作用下, 天門冬酰胺在 40 μ mole 以下時, 反應速度隨底物濃度增加而上升。

(二) 酶促反應和時間的關係 DL-異亮氨酸和 α -酮戊二酸之轉氨作用及酰胺解作用, 在相應的酶催化下, 在 1 小時內, 產物形成之速度, 基本上是直綫關係。

(三) 對熱的穩定性 該兩酶對熱均不穩定, 以不同溫度和酶溶液作用 10 分鐘, 然後以反應條件培養, 支鏈氨基酸-谷氨酸轉氨酶及天門冬酰胺酶分別在 50 度和 60 度時, 失活 80% 左右。

(四) pH 對酶活力的影響 天門冬酰胺酶在 pH 5 以下時, 幾乎全部失活。最適 pH 範圍較寬, pH 為 8 時, 活力最高。

(五) 各種抑制劑的作用 巯基抑制劑對支鏈氨基酸轉氨酶具有顯著的抑制作用; 對氯汞苯甲酸 (10^{-4} M) 抑制 60%。 10^{-2} M 及 10^{-4} M 之溴乙酰胺分別抑制 67% 及 37%。DL-環絲氨酸 (10^{-3} M) 抑制 30%。抑制劑對天門冬酰胺酶活力影響不大; 對氯汞苯甲酸 (10^{-4} M) 抑制 20%, 溴乙酰胺 (10^{-3} M) 僅抑制 15%。DL-環絲氨酸和天門冬酰胺之結構相似, 但 10^{-4} M 作用於天門冬酰胺僅抑制 15%。

*

*

*

郭傳忠、高娟芬、孫登甲和方蘇南同志參加部分實驗工作。

酵母菌過氧化氫酶含量與 其輻射損傷的關係

金元禎 鄒承魯

(中國科學院生物物理研究所,北京)

有關過氧化氫在輻射損傷過程的作用問題,以往,有人曾加入相當於輻射產生的過氧化氫量,與照射引起的損傷比較。或者在照射時加入過氧化氫酶,觀察對於機體的影響。也有人比較了不同機體過氧化氫酶含量與輻射敏感度的關係。然而外加入的過氧化氫是一次加入的,而輻射產生的過氧化氫是絡續產生的,對於機體的損傷作用也就不會完全相同。同時,加入的過氧化氫也有被機體內的過氧化氫酶分解的可能性,而加入的過氧化氫酶能否透過細胞膜進入細胞內,也是疑問。

我們利用酵母菌有氧適應前後,由於適應酶的產生,過氧化氫酶含量的變化,選擇了對於有氧適應比較敏感的和比較不敏感的同屬二個菌株,分別比較它們對電離輻射敏感的情況,避免了種屬之間因代謝類型的差異的影響,以及觀察了抑制過氧化氫酶,對於輻射損傷的影響,來探求過氧化氫與輻射損傷過程的作用關係。

在本工作中,從微生物研究所保藏的 18 株酵母菌中,挑選出酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 同一屬的 2.23 菌及 2.559 菌, 2.23 菌在有氧適應前後的過氧化氫酶活力變化較大, Q_{10} 比值為 3.5—4.9; 另一株 2.559 菌在有氧適應前後的過氧化氫酶活力變化較小, Q_{10} 比值為 1.5—1.8。分別接受相同條件劑量的 X 射綫照射後, 2.23 菌有氧適應前後的存活率比值為 1.0—2.1, 2.559 菌的存活率比值為 1.1—1.8。每次照射均附有 Frick 化學劑量,作為照射劑量的依據。又用 Co^{60} γ 射綫照射 2.23 菌,存活率的比值與 X 射綫照射結果相一致。在我們實驗結果中,不論是 2.23 菌或者是 2.559 菌,在有氧適應後的過氧化氫酶活力,都比有氧適應前大;在多數情況下,有氧適應後的存活率也稍為大些。然而;在有氧適應前後的 2.23 菌遠比 2.559 菌過氧化氫酶變化大,而存活率的變化並不顯著,兩者的存活率變化相接近,並沒有相應的比例關係。

在實驗中還利用脛胺分別抑制有氧適應前後的 2.23 菌及 2.559 菌過氧化氫酶 80—90%,與不加抑制劑的菌液同時進行 X 射綫照射,結果是抑制過氧化氫酶對於存活率,沒有任何影響。

根據以上結果,以及近年來的一些文獻資料,我們認為過氧化氫酶含量的多寡,並不能直接影響輻射損傷程度。

針刺足三里對尿中 17-羥皮質類 固醇含量的影響

萬飭先 張德琇 蔣 滢

(蘇州醫學院生化教研組)

在祖國醫學中足三里是重要的全身性強壯穴位。很可能針刺足三里可以通過腎上腺皮質的作用,加強機體的防禦機能。

實 驗 方 法

用尿中 17-羥皮質類固醇含量作為指標,直接觀察針刺足三里對腎上腺皮質機能活動的影響。採用雌貓為實驗動物,動物房溫度約 15—20°C,分成兩組,一組針刺穴位,另一組針刺非穴位的腿部肌肉作為對照,均留針 20 分鐘。每日針刺,連續 6—8 日,最後二日每日置冷環境中(約 5°C 左右) 2—4 小時。每日或隔日測定尿中 17-羥皮質類固醇含量,進行比較。

取穴方法: 在貓的兩個後腿上取人體足三里相應的位置。(人體足三里位置約在髌骨下三寸,脛骨峭外方一寸)。

尿中 17-羥皮質類固醇測定方法: Porter-Silber 方法。(廣慈醫院: 醫學檢驗,1960)

實 驗 結 果

表 1 穴位組針刺後與針刺加冷環境後尿中 17-羥皮質類
固醇含量 (mg/24 小時) 與針刺前的比較

| 例 數 | 實 驗 前 三 日 平 均 | 針 刺 後 平 均 | 針 刺 加 冷 環 境 後 平 均 |
|-----|--------------------|---------------------|---------------------|
| 10 | 0.1906 | 0.1982 | 0.4730 |
| | 平均增加 (\bar{d}) | 0.0076 | 0.2824 |
| | 標準誤 ($s\bar{d}$) | 0.0236 | 0.0435 |
| | t | 0.322 | 6.47 |
| | | $P > 0.05$ 差別不顯著 | $P < 0.01$ 差別很顯著 |

表2 非穴位組針刺後與針刺加冷環境後尿中17-羥皮質類固醇含量(mg/24小時)與針刺前的比較

| 例數 | 實驗前三日平均 | 針刺後平均 | 針刺加冷環境後平均 |
|----|--------------------|---------------------|---------------------|
| 6 | 0.2313 | 0.2368 | 0.2520 |
| | 平均增加 (\bar{d}) | 0.0055 | 0.0207 |
| | 標準誤 ($s\bar{d}$) | 0.0685 | 0.0847 |
| | t | 0.08 | 0.244 |
| | | $P > 0.05$ 差別不顯著 | $P > 0.05$ 差別不顯著 |

結 論

在室溫環境中，未觀察出針刺足三里對尿中17-羥皮質類固醇含量有何影響。針刺非穴位腿部肌肉，遭受寒冷後，尿中17-羥皮質類固醇含量的增加亦不顯著。針刺足三里，遭受寒冷後，尿中17-羥皮質類固醇含量很顯著增加。足見針刺足三里所起的是調節作用，在正常環境中不能體現，在某些不利環境中，能通過腎上腺皮質的活動，加強機體的防禦機能。

說明：針刺穴位應該包括兩個作用：(1) 針刺的機械作用，(2) 穴位的作用。用“針刺非穴位的腿部肌肉”作為“針刺足三里穴位”的對照，比用“不針刺”作為對照，更能體現出足三里穴位的作用。所以我們採用了前者。

癌腫病人的末梢血液過氧化氫酶

李 英 沈奇桂

(浙江醫科大學生化教研組)

氧化強度的降低是癌腫組織代謝特徵之一。而過氧化氫酶為機體內一種重要的末端氧還酶。不少動物實驗指出，癌腫對肝過氧化氫酶有顯著的抑制作用 (Greenstein 等 1942, Appleman 等 1950, 佐藤八郎 1957, Utsuqi Kazuo 1960, 王延玠 1961)。而癌腫對血液過氧化氫酶活性的影響則意見分歧，一部分作者認為患腫瘤時抑制血液過氧化氫酶活性，可作為癌的診斷 (Zerner 1922, Massarelli 等 1957)；另一些學者的意見與此相反，癌與健康人血過氧化氫酶活性的變化沒有明顯差別 (Richardson 1953, Papadodonlou 1953)。文獻上所用的酶活性單位不一致，這可能是造成實驗結果不一致的原因之一。我們檢查了 64 例癌與貧血病人及 35 例健康人的血液過氧化氫酶，同時比較其活性與單位體積血液、紅血球數及血紅蛋白量的關係以鑑別其活性變化的特異性。我們考慮到，血液過氧化氫酶的測定方法簡易，如其活性變化確可作為診斷癌腫的可靠指標，則具有很大的實際意義，這是本文的目的。

我們採用 Бах 和 Зубковая 的滴定法測定了血液過氧化氫酶活性。酶的活性用三種單位表示：1) 過氧化氫酶數=分解的 H_2O_2 毫克數/30 分鐘/1 毫升血液；2) 紅血球過氧化氫酶指數=分解 H_2O_2 毫克數/ 10^6 紅血球；3) 血紅素過氧化氫酶指數=分解 H_2O_2 毫克數/克血紅素。血紅素量是按 Hellige 改良 Sahli 法測定的。用改良 Neubauer 式血球計數板計算紅血球數。

根據我們的材料，健康人單位體積血液中過氧化氫酶活性與紅血球數關係不大(相關係數 $r=0.26$, $P>0.10$)，而與血紅素量則密切相關($\gamma=0.73$, $P<0.01$)。這可能與過氧化氫酶可保護血紅素不受 H_2O_2 破壞的作用相聯系。健康婦女血過氧化氫酶活性比男性低 10%，這是因女的紅血球和血紅素含量低於男的 10% 的緣故。很可能，性激素的差別通過影響紅血球和血紅素的含量而影響其中過氧化氫酶活性，因紅血球內過氧化氫酶與血紅素量之比男女兩性沒有差別(男性為 0.114，女性為 0.112)。

檢查的結果表明，癌症患者血液過氧化氫酶活性均比健康人的該酶活性低，除以紅血球計算酶單位外，過氧化氫酶數和血紅素過氧化氫酶指數的差別均為顯著(t 值分別為 2.94, 2.06; $P<0.01$ 及 <0.05)。貧血病人血過氧化氫酶活性雖亦普遍下降，但其中只單位體積血液內酶活性下降有明顯差別。至於癌病人與貧血病人的血過氧化氫酶活性的比較：以紅血球數計算時，癌與非癌病人該酶活性無差異；如以單位體積血液計，則癌患者的酶活性高於貧血病人；而以血紅素過氧化氫酶指數表示活性時，則前者却低於後者。但這些變動均無統計學上的意義(P 均 >0.05)。

我們檢查 26 例癌病人中有一半是女性器官癌(乳房癌、子宮頸癌等)，10 例五官癌(主要是鼻咽癌)。應該指出，並不是所有的癌腫病人血過氧化氫酶活性都偏低，五官癌病人該酶活性與正常值相近，甚至稍高些。West 等(1958)報導，不同類型的癌腫對血清乳酸脫氫酶及谷草轉氨酶的影響亦不同，在肺、胃等的癌變時升高，而在咽部癌、食道癌時則不大變動。由此可見，不同器官的癌變對血液中酶的影響並不都是一樣的。在我們檢查的癌病人中，只有女性器官癌病人血過氧化氫酶活性以單位體積血液或血紅素量計算時，才有顯著的下降。但也並非女性器官癌的特徵，因其變化與婦科貧血病人比較沒有什麼差別：紅血球內所含的過氧化氫酶和血紅素之比，二者均降低 25%，女性器官癌病人和婦科貧血病人的過氧化氫酶指數相近。

按文獻材料，腫瘤生長過程常伴有貧血，甚至在癌前期即可觀察到血紅素明顯降低(Strong 等 1937, 1940, Tayler 等 1942)。從我們的檢查結果看來，伴貧血的癌病人只佔少數，大多數癌病人的紅血球和血紅素都在正常值範圍內。癌病人的血紅素量與正常人相同(其平均值均為 11.3%)，但其血紅素過氧化氫酶指數僅為健康人的 86%；女性器官癌病人與健康婦女的血紅素同為 10.4%，但其酶活性下降 27%，紅血球內酶活性與血紅素量的比值，從 0.112 降至 0.083。可見，癌腫對血過氧化氫酶具有一定的抑制作用，只是與貧血病人的該酶變化無明顯區別而已。

Greenstein, Appleman, 佐藤八郎等的實驗，只觀察到腫瘤動物對肝過氧化氫酶活性有抑制作用，而對血液過氧化氫酶無影響。本文作者的工作表明，除五官癌患者血液過氧化氫酶活性不受抑制外，女性器官癌對該酶有明顯的抑制作用，然而其變化不能作為診斷的專一指標，因婦科貧血病人亦有類似的變化。至於癌對血過氧化氫酶的影響機制究竟作用於酶的生成機轉抑是直接作用於酶本身，這些問題都有待進一步的研究。

抗日本住血吸蟲新藥 F-30066 的生化研究

(浙江醫科大學生生化教研組)

I. F-30066 與谷胱甘肽及蛋白質巰基的作用

邵靖宇 林茂芳 湯海祥

F-30066 用於治療血吸蟲病療效良好,但部分患者於服藥後出現局部肌肉痙攣、神經機能和精神狀態失常等現象。F-30066 為一硝基咪喃衍生物,其化學結構與咪喃星 (Furacin) 有共同的 5-硝基咪喃環。Green 等曾報導咪喃星為一巰基抑制劑,能抑制脲酶、琥珀酸脫氫酶和蘋果酸脫氫酶等。最初我們曾觀察到 F-30066 可以使稀釋血液中的血紅蛋白迅速氧化為正鐵血紅蛋白,引起我們對 F-30066 與機體內谷胱甘肽 (GSH) 及蛋白質中巰基關係的注意。本文作者進行了 F-30066 對血液中 GSH、血清蛋白質巰基含量的影響以及動物服藥後血液、組織中 GSH 含量變化的觀察。

GSH 含量的測定採用 Woodward 和 Fry 的 KIO_3 滴定法。所用血液標本都在隔絕空氣的條件下採集,以防空氣氧化。無蛋白組織濾液的制備基本上按 Leaf 和 Neuberger 的方法。血清蛋白質巰基含量的測定則採用 Weissman 等的電流滴定法,僅以一每秒振動 50 次的鉑微電極配合一穩速電磁攪拌器代替原文獻所用的旋轉鉑微電極。所得實驗結果如下。

1. F-30066 可直接與 GSH 作用。以 $1.0 \mu M$ F-30066 與 $10 \mu M$ GSH 置 pH 7.4 磷酸鹽緩衝液中,於 $37^\circ C$ 保溫二小時,另取 GSH 同樣保溫作對照,以 $10^{-3} N$ KIO_3 滴定剩餘 GSH 量計算得一分子 F-30066 約可與 3.6 分子 GSH 作用。

2. F-30066 在體外可使血中 GSH 含量減少。兔血經溶血後加入 F-30066 ($18 \mu M$ /3 ml 血液) 隔絕空氣攪置二小時 ($21^\circ C$) 後制備無蛋白濾液,測得對照組血液中 GSH 含量為 $1.73 \mu M/ml$ 藥物組為 0.68,從而計算得 $1 \mu M$ F-30066 平均可與 $0.18 \mu M$ GSH 作用。以咪喃星代 F-30066 也得相似結果。

3. 豚鼠血、肝、腎和腦中 GSH 的正常值經測得分別為 $1.65 \pm 0.15 (\mu M/ml)$, $6.34 \pm 1.03 (\mu M/gm)$, 4.72 ± 0.46 , 2.27 ± 0.28 (共八例)。動物於給藥 ($1 g/1 kg$) 後均出現戰慄、後腿部肌肉痙攣等中毒症狀,但只小部分動物在 12 小時後血液及肝中 GSH 降低,13 例中的二例血中 GSH 含量為 $1.21 \mu M/ml$, $0.99 \mu M/ml$,肝中 GSH 含量為 4.23 和 4.01。全部動物腎及腦中 GSH 含量均無變化。以咪喃星代 F-30066 也得相似結果。

4. F-30066 與人血清共同置 $37^\circ C$ 保溫二小時,結果表明藥物濃度在 $0.86-4.5 mM$ 之間每 $1 \mu M$ F-30066 平均可使血清蛋白質中原含巰基 (平均為 $0.36 \mu M/ml$) 減少 $0.060 \mu M$ 。我們還觀察到於血清中添加血紅蛋白後再加入 F-30066 保溫,每 μM F-30066 使此混合液中巰基的減少比血清與血紅蛋白分別與 F-30066 保溫時減少得多一些,其作

用數 ($\mu\text{M-SH}/\mu\text{M F-30066}$) 以一次實驗為例, 混合液為 0.055, 血清為 0.043, 血紅蛋白為 0.023。

據以上結果, F-30066 與純 GSH 的作用數可能為 4。其作用方式從該藥物的化學本質來看可能是對巰基的氧化。但血液中 GSH 及血清蛋白質巰基的減少量都遠遠小於此作用數, 估計其原因可能是由於不少一部分藥物被血液中的其它還原性物質所分解。同時還可能由於在我們所用的實驗條件下, 蛋白質分子的巰基與 F-30066 作用不完全。

豚鼠口服 F-30066 後僅能有少數動物肝臟和血液中 GSH 含量降低, 其原因可能是多方面的, 該藥物在動物體內吸收快、排泄快, 組織的採樣時間可能不是藥物在體內濃度最高點範圍內。而且在整體條件下, F-30066 對巰基的氧化可能會受到某些抑制的阻礙。譬如, GSH 被氧化後還可以通過 GSSG 還原酶與需 TPN 脫氫酶類協同作用利用代謝物的氫所還原。本實驗所用的條件下雖然僅在少數動物的肝臟和血液中觀察到 GSH 含量的變化, 但並不排除 F-30066 作為一種巰基氧化劑使機體的某些巰基酶遭受破壞或抑制的可能性。我們檢查了 F-30066 對脲酶 (西瓜子浸出液) 及肌肉琥珀酸脫氫酶活性的影響, 結果表明, 藥物在 2.23 mM 濃度時對西瓜子浸出液中的脲酶沒有什麼抑制。至於 F-30066 對琥珀酸脫氫酶的作用的觀察, 由於發現 F-30066 可使已退色了的甲烯藍重又生色而未能肯定結果。我們考慮到各種巰基酶類對 F-30066 的感受性不一定相同, 因此 F-30066 與巰基酶類的作用有待進一步研究。但我們認為該藥對巰基的氧化作用可以作為對其藥理機制的認識的一個重要方面。

II. F-30066 對糖酵解的影響

邵靖宇 林茂芳

Green 曾報導吡喃星對細菌糖酵解有抑制作用。我們用 F-30066 檢查的結果表明該藥並可抑制哺乳動物及血吸蟲 (成蟲) 的糖酵解。

1. 組織材料的製備: 體外酵解實驗用大白鼠的脾臟及後腿肌肉以 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.8) 製成 10% 勻漿。血球混懸液採取家兔心臟血液, 以檸檬酸鈉抗凝, 分離血漿後用生理鹽水洗滌三次, 加 Krebs-Ringer 溶液至原體積。體內實驗時, 家兔按每日 0.5 g/kg 給藥連續二日, 每日取血樣作乳酸含量測定及血球酵解力試驗。血吸蟲的酵解試驗取感染尾蚴 60 天的家兔, 殺死後用生理食鹽水將成蟲自門脈及肝臟中洗出, 置 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.8) 中研成 5% 勻漿備用。另取感染有血吸蟲的小白鼠的成蟲, 置羊血漿與 Tyrode 溶液按 1:4 混合的培養液中, 每 2.5 ml 放入合抱體二對, 於 32°C 保溫 16 小時, 全部操作在無菌條件, 保溫完畢後測定對照組和藥物組培養液中乳酸量及蟲體質量。

2. 糖酵解的觀察: 取組織勻漿 1 ml, 磷酸緩衝液 2.5 ml (或血球混懸液 3.5 ml) 加含有 20 μM MgCl_2 的 1% 葡萄糖溶液 0.5 ml 及 4.9 mM 或 9.8 mM 的 F-30066 0.5 ml。以液體石蠟杜絕空氣於 37°C 保溫 120 分鐘, 加入 10% 三氯醋酸 2 ml, 取濾液測定乳酸

生成量作為糖酵解強度的指標。以糖元作基質時加腎上腺素 0.5 mg 代替 $MgCl_2$ 。體內實驗時，家兔服藥前後每日取血 1 ml 添加含 $20 \mu M MgCl_2$ 的 1% 葡萄糖溶液 0.5 ml 及 0.1 M, pH 7.8 磷酸緩衝液 3.5 ml, 以液體石蠟杜絕空氣置 $37^\circ C$ 保溫 90 分鐘, 每隔 30 分鐘取出 1 ml 作乳酸測定。

結 果 及 討 論

1. 勻漿及血球混懸液的酵解試驗：藥物濃度為 0.98 mM 時脾、肌勻漿或血球混懸液無論以葡萄糖或以糖元為基質的實驗均全被抑制（沒有乳酸生成）。藥物濃度為 0.49 mM 時均有一半左右被抑制。在部分以葡萄糖為基質的肌勻漿酵解實驗，同時測定得藥物組有磷酸丙糖的積累。

2. 家兔每日口服 F-30066 0.5 g/kg 連續二日，其血中乳酸有下降的趨勢，由 $38 \mu g/ml$ 下降至 $21 \mu g/ml$ ，其血球於 90 分鐘 $37^\circ C$ 保溫的乳酸生成量則由 $23 \mu g/ml$ 下降至零。豚鼠口服 F-30066 也有與兔相似的血中乳酸降低情況。

3. 血吸蟲勻漿的酵解實驗表明，藥物濃度為 0.98 mM 及 0.49 mM（即在與哺乳動物組織勻漿相同的藥物濃度下）沒有乳酸生成。而血吸蟲的體外培養實驗，對照組於 16 小時保溫中乳酸的生成量為 6.11 mg/mg 蟲體氮，F-30066 濃度為 3.6 mM 的培養液中蟲體的乳酸生成量為 4.42 mg/mg 蟲體氮，1.8 mM 時為 6.00 mg/mg 蟲體氮（沒有什麼影響）。

F-30066 用於治療血吸蟲病所發生的肌肉痙攣，神經、精神失常，糖代謝的紊亂可能是其原因之一。因為肌肉與神經組織維持其正常機能所需的能量依靠糖代謝供給。曼氏血吸蟲依靠糖酵解作為體內主要的能源，估計酵解作用在日本住血吸蟲也是重要的供能代謝。F-30066 對血吸蟲糖酵解的抑制作用在蟲勻漿的實驗中顯示得很清楚，但在蟲的離體培養實驗中僅在較高的藥物濃度時才能見到，實驗條件不同可能是其主要原因。估計該藥對酵解的抑制作用與其殺蟲機制有關。

我們的工作於報導 (I) 已指出 F-30066 對巰基有氧化作用。因此該藥對酵解的抑制有很大可能是作用於酵解過程中的巰基酶類。在這些酶中我們曾用澱粉為基質檢查 F-30066 對肌勻漿中磷酸化酶活性的影響，沒有發現有何變化。估計 F-30066 在所使用的濃度下對己糖激酶也不會有什麼影響，因為以葡萄糖或糖元為基質的實驗，酵解受阻的百分數是接近的。至於乳酸脫氫酶，由於本實驗所用的乳酸測定法可以對丙酮酸同樣生色，測定乳酸時實際上已包括丙酮酸在內，因此“乳酸”的降低可表示二者都降低，但並未排除乳酸脫氫酶也同時有受抑制的可能。肌勻漿與 F-30066 共同保溫後乳酸生成量降低的同時有磷酸丙糖的累積，這一事實我們推想磷酸甘油醛脫氫酶受抑制的可能最大，因為該酶是一個“敏感”的巰基酶，並且在酵解過程中起着重要的調節作用。酵母的磷酸甘油醛脫氫酶不受呋喃星抑制，因此 Brodie 等認為該藥的作用機制不是由於對巰基的作用。我們在實驗中觀察到 F-30066 及呋喃星對酵母的發酵作用都沒有影響，這也許只說明該藥物對某些巰基酶作用的種屬或組織特異性。進一步證實 F-30066 對該酶的作用的實驗正在本實驗室進行中。

III. F-30066 對尿素合成的影響

李英 儲範 湯海祥

抗血吸蟲合成藥 F-30066 使用的副作用之一，據臨床報告對血吸蟲病人能引起陣發性肌肉痙攣和神經機能失常等症狀，肌肉痙攣時血鈣和丙酮酸均正常，神經反應頗似肝昏迷前驅症狀，有血氨升高現象。臨床觀察和動物試驗都表明 NH_4Cl 與該藥合併使用時可以增加其毒性。可見 F-30066 的毒性和機體內氨代謝的擾亂有所聯系。本文報導 F-30066 對豚鼠，大白鼠及家兔血氨，血脈及肝臟尿素合成的影響。

家兔從耳靜脈抽血，豚鼠從心臟取血。測定正常值的血氨、血脈，所用血樣都是在動物空腹取的。血氨的含量，根據 Seligson 微量擴散法（但改用硼酸鹽緩衝液）Russell 比色法測定。血脈經脲酶水解後，也用上法測定其分解出的氨。尿素合成用肝切片（Gornall 和 Hunter 1943）或勻漿（Ratner 等 1949）在通氧的 Krebs-Ringer 溶液中進行的，用氯化銨或天門冬氨酸為 NH_3 的來源，加入糖元、乳酸或葡萄糖及 ATP 供給能量，於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 保溫 1.5 小時。合成的尿素測定方法同血脈。在整體試驗中，動物的給藥劑量為每公斤體重一克，於不同間隔時間抽血，觀察其血氨及血脈的變化，於 6.5—7 小時抽血並殺死測定其肝中尿素的合成。

鑑於我們採用脲酶水解法測定尿素，在預備試驗中首先檢查了 F-30066 對脲酶活性的影響。其結果表明，在我們的實驗條件下，使用的藥物濃度高達 $2.23 \times 10^{-3} M$ 對西瓜子及黃豆提取液中脲酶的活性都沒有什麼抑制作用。

為了探索血氨和肝臟尿素合成之間的關係，需要確定的是動物給藥後是否引起血氨的升高及其變動情況。在預試驗中，豚鼠於給藥後血氨確有明顯升高。繼而，我們測定了雄性家兔於給藥後不同時間內血液中氨和脲含量的變化，其結果表明，於給藥後 5—7 小時的血氨上升達最高峯。至於血脈的含量，於給藥後亦有上升，但其變化不如血氨那樣明顯。

藥物對肝尿素合成的影響不論在試管內或在體內試驗中，均可觀察到有明顯的抑制作用。當藥物濃度為 $1.11 \times 10^{-3} M$ 時，二只大白鼠肝切片尿素合成的影響，以糖元作為能源時抑制 70%，以乳酸供能時抑制 40%。以葡萄糖為能源，藥物不同濃度對雄性大白鼠肝勻漿尿素合成的抑制程度亦不同，隨藥物濃度的增加而增大。但二者之間無平行關係，在體內試驗中，服藥後的兔子均在其血氨升高的時間範圍內—6.5—7 小時殺死，製備肝切片進行尿素合成的試驗，我們發現，與血氨升高的同時，尿素合成均受抑制，平均為 20% 左右。

根據以上實驗所得材料，口服 F-30066 可引起血氨升高，這是肯定的。個別兔子在服藥後 5 小時因氨中毒（此時血氨上升達 17 倍之多）而死亡。臨死時表現煩燥和抽筋等症狀。血氨升高的原因是尿素合成受障礙。體外試驗比體內試驗藥物對尿素合成的破壞更加嚴重，這可能是藥物有效濃度不同造成的差異，體外試驗所用藥物濃度甚高。遠非生理狀態下藥物在體內所能達到的水平。應該指出，在體內試驗時，動物一次給藥 1 克/公斤體重，其劑量相等於臨床大劑量 15 天療程的總和。其所造成的對氨代謝干擾程度比臨

床出現的反應可能嚴重些。估計血吸蟲晚期病人服藥後產生肌肉神經反應必和血氨升高相伴出現。測定病人的血氨變化對防治該藥物的毒性有一定的意義。基於實驗結果，可以說，氨代謝紊亂是 F-30066 毒性作用的一個重要環節。如何使機體內氨的濃度降低是臨床上預防使用該藥物時產生副作用的措施之一。上海精神病防治院曾給病者結合使用谷氨酸鈉。其效果良好。但亦有報導（皇甫銘等，1962）用谷氨酸鈉防治無特殊療效。氨中毒的機制目前還不完全清楚。據 Bessmen 等的意見，可用三羧酸循環速度降低學說來解釋，腦中大量的氨奪取了三羧酸循環上的 α -酮戊二酸。



顯然，從而限制了生物氧化過程中能量的生成，而造成腦中能量的缺乏，致發生抽筋。如果這種解釋是正確的話，用 α -酮戊二酸作為氨解毒劑應該更有效些。但考慮到 α -酮戊二酸不能通過“血腦屏障”，而腦中 α -酮戊二酸它要由葡萄糖生成；另一方面，為促進肝中清除 NH_3 的能力而降低血 NH_3 濃度，我們認為同時應用葡萄糖，谷氨酸和精氨酸更能提高其療效。至於精氨酸可降低血氨改善 NH_3 中毒，不論在臨床使用和動物實驗都已證實。

IV. F-30066 對肝勻漿氧化磷酸化作用的影響

李 英 劉子貽 王水珍

我們實驗室的工作，已於前文報導，F-30066 於 $4.9 \times 10^{-4} M$ 濃度可抑制動物（兔、大鼠、豚鼠）的肌肉、血球、脾等組織的糖酵解 50% 左右，抑制血吸蟲成蟲的糖酵解 100%。這樣，相應地也抑制了動物和蟲體內糖在無氧分解產生的能量。

F-30066 為 5-硝基咪喃類化合物，其分子中含有硝基和不飽和鍵，非常可能，也同咪喃星一樣，作為電子接受體干擾細胞呼吸作用，從而在生物氧化過程中也抑制了 ATP 的生成，這對該藥物的殺蟲和毒性都有着重要作用。本文作者初步觀察了 F-30066 對肝勻漿的氧化磷酸化作用的影響。

方 法

(1) 肝勻漿的製備：將動物（大白鼠、兔）擊昏、砍頭、放血，迅速取出肝臟，放入冰冷之 1.15% KCl-KHCO_3 緩衝液 (pH 7.4) 中，洗去血污，用小片濾紙吸乾，稱重，剪成小塊，放在全玻璃的勻漿器中，以冰冷的 KCl-KHCO_3 緩衝液研成 10% 等滲勻漿。製勻漿過程均在冰水中進行。

(2) 氧化磷酸化作用的測定：實驗是用 Warburg 呼吸儀進行的。在冰浴上加作用液各成分， F^- 必需最後加，以避免發生混濁。反應瓶的中心小杯放 0.2 毫升 20% KOH 及 $0.8 \times 3 \text{ cm}$ 小濾紙條以吸收 CO_2 。通氧 10 分鐘，移放 30° 水浴槽中，平衡溫度 10 分鐘，繼續保溫 20 分鐘，讀取氧的吸收量，用外推法計算 30 分鐘內耗氧總量。保溫完畢時，

加冰冷的 14% 三氯醋酸 2 毫升以停止作用，濾液中“真正”無機磷按 Fiske 和 Subbarow 法測定之。對照管中先加三氯醋酸後加勻漿，以便立即固定蛋白質。蛋白質固定後均保存於低溫，以防止酸不穩定磷的分解。

(3) 酵母己糖激酶係按 Sols 等方法製備，酶製劑的蛋白質用雙縮脲法或分光光度計法測定，每 1 毫升酶製劑含蛋白質 31 毫克。

在我們的實驗中，用葡萄糖和己糖激酶作為氧化磷酸化的磷酸二級受體。為此，首先檢查了 F-30066 對酵母己糖激酶活性的影響。在肯定了藥物對己糖激酶無影響的基礎上，我們預先用大白鼠做了一批體外試驗，其結果表明， $10^{-3} M$ F-30066 對以丙酮酸和琥珀酸為基質的氧化磷酸化抑制 40—50%，當藥物濃度為 $10^{-4} M$ 時抑制約 10%。然後，用家兔同時進行了體內和體外的實驗，體外實驗的結果以大白鼠材料相似。藥物需較高濃度對肝勻漿的氧化磷酸化呈現明顯的抑制作用。 $10^{-3} M$ F-30066 對兔肝勻漿氧化磷酸化以丙酮酸為基質抑制 47.0%、 α -酮戊二酸 40.6%、琥珀酸 40.0%，主要抑制磷酸化作用，對氧化的抑制均不甚顯著。不加基質時耗氧抑制 17.5%，磷酸化抑制 44.2%，外加各種基質時耗氧的抑制更低些，只抑制 10% 左右，但磷酸化的抑制平均將近 50%。在體內實驗時家兔給藥每公斤體重 1 克，於喂藥後 7 小時左右殺死，此時，只有丙酮酸和 α -酮戊二酸在兔肝勻漿中的氧化磷酸化受抑制，其抑制強度為 19.5% 和 23.0%，比體外實驗中藥物濃度為 $10^{-4} M$ 時的抑制程度稍高些。

F-30066 和呋喃星 (Furacin) 均為硝基呋喃類化合物，它們在呋喃環上第五位有一硝基並在二位的側鏈上都有一不飽和鍵：



推想此二化合物在機體內的作用會有許多相似之點。細菌和動物組織均能還原呋喃星。Taylor 等的工作，發現呋喃星能抑制黃嘌呤氧化酶活性 ($8.7 \times 10^{-4} M$ 抑制耗氧量 53%)，在無氧時呋喃星被還原。以後，Brodie 等從呋喃星對一些呼吸酶 (磷酸甘油醛脫氫酶、黃酶、細胞色素氧化酶) 活性影響的實驗中觀察到呋喃星可與氧或甲烯藍競爭奪取還原型黃酶上的氫，作者們認為呋喃星可代替細胞色素接受黃酶上的氫，從而阻斷了黃酶和細胞色素 C 之間的聯系。在我們的實驗條件下，F-30066 在體外實驗，當濃度為 $10^{-4} M$ 對肝勻漿的氧化磷酸化作用的影響不甚顯著，但在較高濃度時則表現明顯的抑制作用，不論用琥珀酸、丙酮酸或 α -酮戊二酸為基質 (當然還包括肝勻漿中的內源性基質)， $10^{-3} M$ 抑制氧化磷酸化幾達 50%。在體內實驗中，該藥對琥珀酸的氧化磷酸化沒有什麼影響，而對丙酮酸及 α -酮戊二酸則有 20% 的抑制作用。呋喃星對細菌及動物組織的琥珀酸脫氫酶和丙酮酸氧化酶也均有抑制作用 (Green 等 1948, 1951; Asnis 等 1951, Paul 等 1952—1956)。Green 等報導，除呋喃星外，其他 5-硝基呋喃衍生物同樣也可抑制細菌丙酮酸氧化。從我們的實驗材料看來，F-30066 對琥珀酸脫氫酶和丙酮酸氧化酶的抑制作用不大明顯， $10^{-3} M$ 的藥物只使兩者的耗氧量降低 10% 左右。

白地霉的戊糖代謝

2. 木糖與葡萄糖培養菌株糖代謝的比較

楊康婉 方一澄 張樹政

(中國科學院微生物研究所,北京)

作者曾於北京市生理科學會 1961 年會報導過白地霉木糖代謝的初步變化途徑,推測木糖經過初步變化之後將參予已知磷酸戊糖循環及 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 酵解途徑,以及三羧酸循環。但在白地霉中這些途徑存在之證明尚未見有報導。因此我們進行了這些酶體系的測定,又因為木糖代謝有關的酶均為適應酶,為了闡明由於適應酶的形成或木糖代謝的特殊需要是否會影響其他酶活力以及不同途徑的相對比重,所以將木糖及葡萄糖培養菌株作了比較,並用 C^{14} 標記的葡萄糖進行了呼吸試驗。

用完整靜息細胞作了對不同糖類(共 16 種)的氧化實驗,發現木糖培養的細胞對木糖氧化的能力比葡萄糖培養的細胞大大提高(6.8 倍)。

用無細胞提取液測定了 EMP 途徑,磷酸戊糖循環,三羧酸循環及乙醛酸循環的重要酶活力(包括己糖激酶、磷酸己糖異構酶、醛縮酶、3-磷酸甘油醛脫氫酶、磷酸甘油酸變位酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶、醇脫氫酶、6-磷酸葡萄糖脫氫酶、轉酮酶、異檸檬酸脫氫酶、順烏頭酸酶、琥珀酸脫氫酶、蘋果酸脫氫酶、草酰乙酸羧化酶、異檸檬酸酶等)共 16 種,由實驗結果知白地霉中這些酶均存在,木糖及葡萄糖培養的菌株酶活力無重大差異。

用葡萄糖-1- C^{14} 及全標記的葡萄糖-1-6- C^{14} 作了呼吸實驗(呼吸時間 60 分),計算 C_1/C_{2-6} 比值,木糖培養菌株為 0.97,葡萄糖培養菌株為 1.07,可知在不同糖代謝途徑的相對比重方面亦無重大差異。

兩株菌的主要差別只在於木糖培養菌株適應生成了與木糖代謝直接有關的酶類。此結果與 Hoffmann-Ostenhof 報導的用肌醇與葡萄糖培養的西方施旺氏酵母 (*Sclwanomyces Occidentalis*) 的結果相同。

生活在低溫下大鼠肌肉綫粒體 氧化磷酸化的研究

于樹玉 沈翊珩 姜明軒 王世旗 李士諤

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

文獻上已有實驗證明,冷適應動物肝的氧化磷酸化效能(P/O 比值)較對照組為低,對產生此種現象的機制,也曾進行過研究^[1-4]。但對維持體溫,具有巨大產熱潛力的骨骼肌在冷適應情況下綫粒體中能量轉換的研究較少。有人曾報導鴿子在短時間寒冷情況下,其胸肌綫粒體氧化磷酸化有斷偶聯現象,P/O 比值的下降程度與體溫變化有相應關係^[5]。此種斷偶聯現象可能是機體對冷適應的一種生理調節機制。為進一步探索這一機制,了解動物在寒冷適應過程中肌肉綫粒體能量的轉換具有重要意義。

本實驗比較了在低溫($-3 \pm 2^\circ\text{C}$)及室溫($28 \pm 2^\circ\text{C}$)下飼養的雄性 Wistar 大白鼠(體重 150—200 克)不同時期肌肉綫粒體氧化磷酸化效能。結果發現大鼠冷適應一天肌肉綫粒體 P/O 比值(用瓦氏呼吸器測氧的吸收,以無機磷在保溫過程中消失量計算磷酸化程度,己醯激酶及葡萄糖作為 ATP 的受體)即有較明顯的下降(約為對照組的 76%),隨冷凍時期的加長,P/O 比值有漸增趨勢。Panagos 報告^[2],冷凍一天肝綫粒體的氧化磷酸化無斷偶聯現象,二週時 P/O 比值約下降 26%。我們用肝綫粒體試驗也得到類似的結果。故肌肉綫粒體氧化磷酸化的改變較肝出現為早。此種早期出現的氧化磷酸化斷偶聯現象可能是機體產生緊急熱能調節的一種生化機制。

為了進一步探索肌肉綫粒體 P/O 比值下降的機制,首先對 ATP 酶活性進行了研究(以無機磷釋放量 $\mu\text{m}/\text{mg}$ 綫粒體蛋白質計算)。結果發現冷凍二週之大鼠肌肉綫粒體 ATP 酶活性較對照組高 30%,且此酶已不為二硝基酚所激活。冷適應過程中 ATP 酶的活化可能是導致 P/O 比值下降的因素之一。

其次,綫粒體的組成結構與其功能有密切關係。按 Cleland 方法^[7]觀察肌肉綫粒體懸浮液在室溫老化過程中光密度的變化,發現冷凍組的改變不如對照組敏感。同時發現該懸浮液放置室溫一小時後較對照組有明顯的凝聚現象。綫粒體經機械力處理後(在玻璃勻漿器中快速磨 20 分鐘),冷凍組只具有呼吸功能,而磷酸化作用已消失;但對照組仍保有部分磷酸化功能。以上現象表明冷凍組肌肉綫粒體的組成結構不如對照組的緊密。此種變化也可能使氧化磷酸化發生斷偶聯現象。

在冷凍過程中,我們還觀察到甲狀腺與腎上腺皆有腫大現象。腎上腺腫大開始較早,二週時達對照組的 163%。甲狀腺在冷凍一週後開始腫大,三週時達到對照組的 176%。已知甲狀腺素有影響肝綫粒體形態及使氧化磷酸化斷偶聯作用,並在冷適應過程中起着調節能量轉換的作用^[3-4],但是甲狀腺素對肌肉氧化磷酸化無影響^[8-10]。故冷適應過程中肌肉綫粒體氧化磷酸化的調節機制可能與肝綫粒體有所不同。

- [1] Hannon, J. P.: Am. J. Physiol. 196, 890, 1959.
 [2] Panagos, S. Beyer, R. E. & Massoro, E. J.: Biochim et Biophys. Acta. 29, 204, 1958.
 Patkin, J. Massors, E. J.: Am. J. Physiol. 199, 201, 1960.
 [3] Lianides, S. P. & Beyer, R. E.: Nature. 188, 1196, 1960.
 [4] Smith, R. E.: Fed. Proc. 19, 140, 1960.
 [5] Скулаев, В. П.: 第五屆生化會講報告。
 [7] Cleland, K.W.: Nature. 170, 497, 1952.
 [8] Северин, С. Е.: Биохимия. 22, 259, 1957.
 [9] Ларьнова, Т. И.: Вопр. Мед. Хими. 2, 3, 1956.
 [10] Северин, С. Е., Ян. фу-юй: Биохимия. 25, 855, 1960.

以硫酸右旋糖酐大量分離 人血清 β 脂蛋白的研究

王克勤 陳玉芳 冉碧芳

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系, 北京)

爲開展 β 脂蛋白的結構與功能的研究, 需要較大量的純淨 β 脂蛋白。關於該蛋白質的分離, 許多作者都採用超速離心方法^[1-3], 但該方法不能較大量分離, 所需離心力大 ($105,000 \times G$), 離心時間長 (20 小時以上), 不能普遍使用。此外用來上浮 β 脂蛋白的鹽溶液的濃度頗大, 對脂蛋白可能引起變性。近年來 Bernfeld 等^[4] 發現硫酸多糖化合物, 可在中性 pH 與 β 脂蛋白形成不可溶的複合分子。Oncley 等^[5] 曾用大分子硫酸右旋糖酐 (Dextran Sulfate 簡稱 D.S.) 沉澱血清 β 脂蛋白 (BLP), 可以大量分離, 但在分離 D.S.—BLP 複合分子時仍用超速離心法, 故尚受到一定限制。本報告介紹一個大量分離和純製 β 脂蛋白的較爲簡便的化學方法。

本法係參考 Bernfeld^[6] 的方法並略加修改, 採用自己合成的硫酸右旋糖酐 (右旋糖酐分子量 39 萬、內粘度 0.5) 沉澱 BLP, 其主要步驟如下:

- (1) 去除血清乳糜微粒。
- (2) 在上述去乳糜微粒血清中, 加入適量的 D.S., 使最大量地形成 D.S.—BLP 不溶複合分子。
- (3) 用 0.02 M Na_2HPO_4 反覆洗滌 D.S.—BLP 沉澱, 以除去其他蛋白質。
- (4) 用醋酸鉍分離 D.S.—BLP 複合體, 形成 D.S.—Ba 複合分子而沉澱下來, 得到 BLP 溶液。
- (5) 加 Na_2SO_4 至 BLP 溶液中, 以除去中過量的醋酸鉍。
- (6) 透析 BLP 溶液, 以除去過量的硫酸鉍。

以上各步驟均在 $0^\circ - 4^\circ\text{C}$ 進行, 最後獲得一透明, 淡橘黃色的 BLP 溶液。

Bernfeld^[7] 曾指出硫酸多糖化合物與 BLP 形成不溶的複合體, 是與硫酸多糖的

分子大小，硫酸化程度，以及有無其他基團有關。爲鑑定自製 D.S. 能否特異地與血清 BLP 形成不溶的複合分子，將全血清，去除 D.S.—BLP 複合分子的血清，及最後所得 BLP 溶液進行紙上電泳，電泳後分別進行脂質與蛋白質染色。結果發現去除 D.S.—BLP 複合分子的血清無 BLP 存在，僅在 α 脂蛋白部位有脂質染色，而最後 BLP 溶液的電泳圖譜，恰恰與去除 D.S.—BLP 的血清相反，只在 BLP 部位有脂質染色， β 球蛋白部位有蛋白質染色，而在其他部位均無顏色呈現。上述結果充分說明 D.S. 只特異地與血清 BLP 作用形成複合分子，而不與 α 脂蛋白或其他蛋白質反應。

爲了證明 D.S.—BLP 複合分子可否用化學方法分開及 D.S. 能否完全除淨，將 D.S.—BLP 複合分子溶液及醋酸鉍沉澱 D.S. 後的 BLP 溶液分別作紙上電泳，電泳後分別進行三種染色——蛋白質、脂質、蛋白質與酸性多糖一同染色。結果發現二者都能顯示蛋白質與脂質染色，且只有一個區帶。而蛋白質與酸性多糖一同染色圖譜則不同，D.S.—BLP 複合分子有酸性多糖染色，而 BLP 溶液則無。說明 D.S. 與 BLP 形成複合分子後，可以用醋酸鉍分開，且分離後的 BLP 不含有 D.S.。

此外我們還觀察到：BLP 在微量瓊脂電泳上只出現一個點，在免疫電泳上只呈現一條明顯的沉澱弧，其位置均與血清 α_2 球蛋白的位置一致。說明所製 BLP 溶液爲一純淨的蛋白質，只有一種免疫性。吸收光譜在 260—300 $m\mu$ 波長間有一不明顯的吸收峯，在 420—500 $m\mu$ 波長間有一明顯的吸收峯，此與 Oncley^[5] 等所得結果一致，說明在製備過程中無變性發生。用 Phywe 分析超速離心機分析，離心力 $2.3 \times 10^5 \times G$ ，溶液密度爲 1.063，在不同時間觀察，均僅呈現一個峯，其上浮速度爲 $S_7, 10$ 左右，與 Oncley^[5] 等用純超速離心分離的結果相似。以上結果進一步說明所製備的 BLP 是純淨的，只含有 $S_7, 10$ BLP。

本方法可以大量分離和純製人血清 β 脂蛋白，每次可分離人血清約 400 毫升。

參 考 文 獻

- [1] Lindgren, F. T., H. A. Elliott and J. W. Gofman: *J. Phys. and Colloid Chem.* **55**: 80, 1951.
- [2] de Lalla, O. F. and J. W. Gofman: in *Methods of Biochemical Analysis*, Edited by D. Glick, New York, Interscience Publishers, Inc. Vol. I. p. 459, 1954.
- [3] Havel, R. J., H. A. Eder and J. H. Bradgon: *J. Clin. Invest.* **34**: 1345, 1955.
- [4] Bernfeld, P. and B. J. Nisselbawm: *Fed. Proc.* **15**: 220, 1956.
- [5] Oncley, J. L., K. W. Walton and D. G. Cornwell: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 4666, 1957.
- [6] Bernfeld, P.: *Fed. Proc.* **16**: 153, 1957.
- [7] Bernfeld, P., J. S. Nisselbaum, B. J. Berkeley and R. W. Hansan: *J. Biol. Chem.* **235**: 2853, 1960.
- [8] Green, C., J. L. Oncley and Karovsky: *J. Biol. Chem.* **253**: 2884, 1960.

大腸桿菌可溶性核糖核酸的提取 及其性質的研究

吳冠芸 胡炳晟 楊秋霜 劉樹忠 張福徽
陳煜清 劉承斌 魏文玲 陳海深 梁植權

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

可溶性核糖核酸(s-RNA)在蛋白質生物合成中有着重要的作用,能將激活的氨基酸傳遞給微體核蛋白。而且,s-RNA的分子量較小,是研究核酸結構的良好材料。因此用比較簡易的方法得到較大量的s-RNA,在進一步研究它的結構和功能問題上是很有意義的。近年來,關於可溶性核糖核酸的提取,理化性質及其生物活性的研究工作很多。但是,一般在提取方法上還是比較繁複,尤其是需用超速離心機,在產量上受到很大限制。

本工作提供了一個比較簡單,不用超速離心製備大腸桿菌s-RNA的方法,並對製得的樣品進行了理化性質和生物活性的測定。

將對數生長期的大腸桿菌收穫洗滌後,加入二倍重的水,三倍重的酚,在20°C攪拌2小時。旋離(1350g,20分鐘,±4°C),取出上清液,重覆用1/2體積90%酚處理二次。上清液加入硫酸銨(0.365克/毫升),旋離(19,000g,30分鐘,±3°C),除去分子量較大的核糖核酸。再將上清液透析除去硫酸銨,加入0.1體積的20%醋酸鉀(pH5)及2.5體積乙醇沉澱s-RNA。其中所含的多糖,按照Kirby^[1]法用2-甲氧基乙醇除去。這樣得到的製品具有較高的接受氨基酸的能力。在沒有ATP或s-RNA或酶的存在下,均無氨基酸參入作用,此與文獻材料相符。s-RNA的加入量與S³⁵-甲硫氨酸-s-RNA的形成有着直線關係,說明S³⁵-甲硫氨酸是確與s-RNA相結合的。根據實驗結果計算,每一微克分子的RNA核苷酸(即0.01N KOH溶液中260m μ 光密度為10)可以攜帶約0.3毫微克分子的S³⁵-甲硫氨酸。化學分析結果顯示製品中含蛋白質約1%,含多糖4—5%,脫氧核糖核酸含量不超過1%。自由電泳及沉降圖譜皆呈現單一峯。比旋光度為+157。克分子磷消光係數在7000—7500之間。258m μ 與230m μ 光密度之比在1.9—2.1之間,258m μ 與280m μ 光密度之比在2.1—2.3之間。用核糖核酸酶或KOH降解後測定末端,經紙層分離,只得到腺嘌呤核苷,無其他核苷發現。從測得的末端腺嘌呤核苷量與鹼基組成計算分子量在26,000左右。我們也進行了沉降係數和擴散係數的測定,由二者計算的分子量和上述數值極為一致。

主要參考文獻

- [1] K. S. Kirby: Biochem. J. 64, 405, 1956.

血清蛋白澱粉膠電泳方法研究

王 兆 裕

(第四軍醫大學生化教研室, 西安)

自 1955 年 Smithies 發表澱粉膠電泳方法以後, 廣泛應用於蛋白質等研究方面, 其優點為電泳圖譜清晰, 缺點為電泳所需時間較長, 澱粉膠板製做不易掌握, 電泳後蛋白質染色及測定方面亦比較困難。針對以上情況提出一種簡易快速澱粉膠電泳方法, 並且對電泳條件進行了探討, 其結果如下:

實 驗 方 法

巴比妥緩衝液 離子強度 0.025, pH 8.6。

電源 定電壓 250 伏, 電流 4—6 mA/厘米。

澱粉膠液 取精製純可溶性澱粉 3 克, 精製瓊脂 0.3 克加入上述緩衝液 100 毫升中, 加熱至開始沸騰為止 (必要時可減壓), 在加熱過程中避免水分損失及膠液變黑。加入瓊脂主要是便於掌握膠板製做。

血清脂蛋白預染色 血清脂蛋白按 Larkey 與 Belko 二氏法預先染色 (血清蛋白則不預先進行染色處理)。

電 泳 操 作

1. 製備膠板 將濾紙裁成與載玻片 (7×2.5 厘米) 寬度相等長度為 6 厘米大小紙片, 以緩衝液潤濕後平鋪於載玻片上, 紙片兩端各距玻片端 0.5 厘米, 除掉濾紙片上吸附多餘的緩衝液。將載玻片以水平位置放好, 吸取 90°C 左右澱粉膠液約 2.5 毫升, 迅速平鋪於紙片之上, 厚約 1 毫米左右, 在室溫冷卻後使用。

2. 加樣品 以 2.4×0.1 厘米小濾紙條蘸取血清蛋白, 然後除掉小紙條上吸附多餘的血清蛋白, 橫置於膠板中央與電流方向垂直, 血清蛋白量以 0.003 毫升為宜。血清脂蛋白電泳加樣品方法相同, 蘸取染色血清脂蛋白量以 0.01 毫升為宜。

3. 接通電源 以緩衝液潤濕 2.5 厘米寬長度適當的濾紙條做為鹽橋, 鹽橋一端附着於膠板兩端 0.5 厘米處, 另一端伸入緩衝液槽中。接通電源後, 血清蛋白電泳時間為 8—10 分鐘, 血清脂蛋白為 3—4 分鐘, 然後將血清蛋白膠板樣品於 100—105°C 水平位置烘乾 15 分鐘。血清脂蛋白樣品則在暗處於 40—50°C 水平位置烘乾。

4. 測定

血清蛋白 將乾燥後血清蛋白樣品浸入溴酚藍染色液中染色 15 分鐘, 然後依次在 5% 醋酸洗液中洗脫, 在洗脫過程中紙片即自行與玻片脫離, 最後將紙片在室溫中涼乾, 按色帶分別剪下溶於 0.01 N NaOH 溶液中, 30 分鐘後進行比色測定, 波長 580 m μ 。

血清脂蛋白 將乾燥後血清脂蛋白樣品浸入蒸餾水中, 待紙脫離玻片後取出紙片於室溫涼乾, 由於脂蛋白預先染色在電泳過程中即呈現出色帶, 可直接按色帶分別剪下溶於

20%醋酸乙醇溶液中進行比色測定,波長 525 m μ 。

本 法 特 點

1. 電泳圖譜清晰,重複性良好。小血鼠血清蛋白電泳結果分出 5 部分: I (63.7% \pm 2)、II (4.6% \pm 0.3)、III (15.5% \pm 1.6)、IV (13.9% \pm 0.6)、V (2.1% \pm 0.5), (所列數值未經校正,各部分蛋白性質正在進一步探討中)。人血清 α 脂蛋白為 35.9% \pm 1.7, β -脂蛋白為 64.1% \pm 1.5, 24 例健康人 (20—40 歲) 血清 α 與 β 脂蛋白平均結果與國內外文獻報告相符。

2. 電泳時間短。由於使用濾紙片做為膠液的載體,在烘乾過程中膠液即被紙纖維所吸收,泳動後各部分蛋白質亦被固定於紙片上,因而容易進行劃分洗脫法比色測定。實驗結果表明泳動是在膠液部分中進行,幾種濾紙做為載體比較結果證明與濾紙性能無關,但採用濾紙片做為載體與紙電泳比較可使電泳時間顯著縮短。

3. 本法由於電泳所需時間較短可採取開放式電泳,採作簡單,而且使用緩衝液量較少 (約 80 毫升),每次電泳完畢後將正負電極互移,緩衝液可連續使用 2 星期。本法應用於動物肝組織可溶性蛋白電泳,電泳圖譜分為 4 部分。

主 要 參 考 文 獻

- [1] B. J. Larkey and J. S. Belko: A modification of method for Prestaining α and β lipoprotein separated by paper electrophoresis, Clin. Chem., 5 (6), 566, 1959.
- [2] P. Moinat, W. Appel and E. F. Tuller: Ectn. of lipoprotein by paper electrophoresis, Clin. Chem., 4(4), 304, 1958.
- [3] Bier, Electrophoresis, p. 226, 1959.

飢餓大白鼠肝腦的谷氨酸代謝

李芳生 徐 洵

(瀋陽醫學院生化教研組)

關於動物完全飢餓時的能代謝,糖及脂肪代謝的研究較多 (Ильин 等 1955, Schole 1961, Lyon 等 1955, Wieland 等 1960, Numa 等 1961, Knoche 等 1961)。但對此時氨基酸代謝研究較少。

近來通過胰腺切除,腎上腺皮質激素作用結合絕食手段,對此時的氨基酸代謝以及有關酶類尤其以谷氨酸為中心的轉氨酶及谷氨酸脫氫酶的研究有所增加 (Gavosto 等 1957, Rosen 等 1958, Beaton 等 1957, Разина 1960)。

Rosen 等 (1958, 1959) 及 Hohorst 等 (1961) 的工作表明飢餓與糖尿病肝的代謝有很大的類似,因而關於飢餓時與糖元異生有密切聯繫的酶系如轉氨酶和谷氨酸脫氫酶 (Браунштейн 1949, 1958) 活性的研究是很重要的。

我們除就飢餓動物肝及腦組織的谷氨酸脫氫酶 (GD), 轉氨酶 (GT) 進行了分析外

還測定了 Krebs 等 (1960) 及 Borst 等 (1960) 所證實的動物組織中谷氨酸的主要氧化途徑即轉氨氧化成天冬氨酸的酶促活性 (GOA)。

實驗方法及實驗結果

動物：220±40 g 的雄性大白鼠，分組按日期不同先後開始完全絕食，只保證水的攝取，以後在同一天進行酶活性的測定。肝腦組織勻漿的製備及酶活性的測定方法如前次研究 (作者 1962)。酶活性以單位乾組織 60 分反應後生成的氨基酸微克分子數 (μ moles / 乾組織 1g 60') 表示。

實驗結果總結如附表所示，肝 GD 活性在嚴重飢餓條件下到第 8 天表現明顯的增高，腦 GD 活性幾乎一直不變。

附表 完全飢餓對大白鼠肝及腦組織谷氨酸代謝酶系活性的影響

| 動物組 | 動物數 | GD "還" 活性 | | GOA 活性 | | AGT 活性 | | TGT 活性 | |
|-------|-----|-----------|---------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|-------|
| | | 肝 | 腦 | 肝 | 腦 | 肝 | 腦 | 肝 | 腦 |
| 對照 | 6 | 191.8 | 31.0 * ₁ | 89.1 | 194.2 * ₂ | 735.3 | 752.3 * ₃ | 110.0 | 33.5 |
| 餓 2 日 | 8 | 164.6 | — | 75.9 | 191.2 | — | — | 230.0 | — |
| 餓 5 日 | 8 | 169.9 | 32.6 | 57.7 | 115.2 | 621.1 | 621.1 | 210.0 | 104.8 |
| 餓 8 日 | 8 | 301.4 | 35.1 | 14.7 | 134.4 | 750.0 | 750.0 | 229.0 | 59.9 |

註：*₁ *₂ *₃ 分別為 12 區, 7 區, 及 4 區的平均數字。

培養條件：(主要基質的最後濃度)。

GD "還" (谷氨酸脫氫酶) α 酮戊二酸 0.04 M, NH₄Cl 0.04 M, 檸檬酸 0.001 M。

GOA (谷氨酸轉氨氧化成天冬氨酸的酶系) 谷氨酸 0.04 M。

AGT (谷氨酸天冬氨酸轉氨酶) α 酮戊二酸 0.08 M, 天冬氨酸 0.04 M。

TGT (酪氨酸 α 酮戊二酸轉氨酶) α 酮戊二酸 0.08 M, 酪氨酸 0.004 M。

各加勻漿 0.4 ml, 全量 1 ml, 37°, 60' (只 GOA 在瓦氏呼吸器上耗氧振盪培養)

酶活收單位均為 μ moles / 乾組織, 1g, 60'。

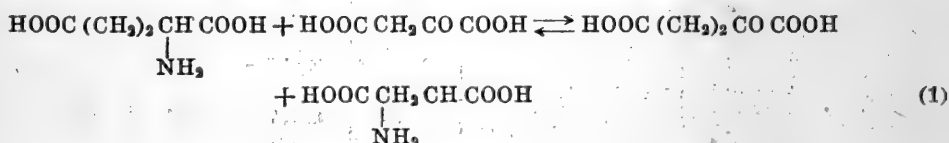
最明顯的變化是 GOA 酶系，肝到絕食第 8 天降到只有對照的 16.5%，腦內 GOA 的活性在絕食 2 日後幾乎無變化，5 天後下降到一定程度，以後證明即或絕食到 11 天幾乎仍維持着約為正常值的 60% 的活性。但與此同時肝及腦的谷氨酸天冬氨酸轉氨酶 (AGT) 活性幾乎很少變動即一直保持着原來的高活性狀態 (這一點證明上述 GOA 酶系活性的下降，其原因不在反應的這一環節上)。為此同時另一種轉氨酶 TGT，在肝及腦均顯出活性的增加。

初生大白鼠及成鼠肝腦中谷氨酸 氧化酶系的對比研究

李芳生 徐 洵

(瀋陽醫學院生物化學教研組)

關於動物體內的氨基酸代謝途徑一直把建立在轉氨酶和谷氨酸脫氫酶基礎上的聯合過程作為主要的代謝機構 (Брауштейн 1949, Meister 1955), 但許多研究表明動物組織中谷氨酸脫氫酶活性是很低的 (Strecker 1957; Jones 等 1961)。Krebs 等 (1960) 及 Borst 等 (1960) 證明動物組織中谷氨酸的氧化主要是通過下述機構實現的:



同時指出了這一機構的合成意義, 如天冬氨酸的參加嘌呤及嘧啶核苷酸的合成 (Reichard 等 1953, Lukens 等 1956, Miller 等 1962)。

構成此機構的酶系除谷氨酸天冬氨酸轉氨酶外還包括檸檬酸循環的過程, 因而對此系統的細節的研究亦屬重要。如有人報告谷氨酸天冬氨酸轉氨酶同機體的生長蛋白合成有關 (Бередев 1961 a, b) 根據個體發育中一系列的酶活性常是在生後不斷增強 (Boell 等 1950, Shen 1955, Moog 1947, 1950, Walker 等 1962) 這一特點, 同時考慮到蛋白質核酸是一切生長的基本條件這些事實, 那麼是否谷氨酸的這一氧化機構在初生動物 (以致胚胎發育中) 即將具有較高的活性。為了對比的觀察初生動物與成鼠體內的谷氨酸代謝情況除就谷氨酸轉氨氧化成天冬氨酸的酶系 (GOA) 及谷氨酸天冬氨酸轉氨酶 (GAT) 進行分析外, 還測定了谷氨酸脫氫酶 (GD) 和酪氨酸 α 酮戊二酸轉氨酶 (TGT)。

GD: 考慮到 Krebs-Borst 的機構, 所以未用測定 DPN 還原辦法 (Strecker 1953, 1955), 而是採取逆反應的 α 酮戊二酸還原氨基化生成谷氨酸的辦法 (Кретовиу 1950, Каилянский 等 1956)。並以 GD “還” 表示。

GOA 按 Krebs (1960) 轉氨酶按一般術式 (Поляков 等 1962, Hird 等 1950), 培養後對反應生成的氨基酸通過濾紙色層分析法定量 (層析及溶劑參考 Сисакян 1962, 呈色按 Mayer 1957) 濾紙為 Whatman No. 1。

附表：初生大白鼠及成鼠肝，腦組織谷氨酸代謝酶類的活性對比

| 組 | 動物數 | 肝酶活性 (μ moles/乾組織 1g, 60') | | | 腦酶活性 (μ moles/乾組織 1g, 60') | | |
|---------|-----|---------------------------------|------|-------|---------------------------------|--------|-------|
| | | GD "還" | GOA | GAT | GD "還" | GOA | GAT |
| 初生鼠 | 20 | 27.0 | 98.7 | 571.4 | 17.5 | 118.7 | 232.1 |
| 成鼠 | 13 | 172.9 | 92.8 | 713.7 | 14.8 | 194.2 | 832.9 |
| 變動 | — | +540% | -6% | 27.5 | -15.4% | +67.5% | +282% |
| 顯著性 (P) | — | <0.005 | >0.5 | <0.05 | >0.5 | >0.05 | <0.05 |

註：主要的培養條件如下：

GD "還"：0.4 M α 酮戊二酸 0.1, 0.2 M NH_4Cl 0.2, 0.2 M 檸檬酸及 0.1 M 丙二酸各 0.05, 0.155 M KCl 組織勻漿 (通過 Potter 玻璃勻漿器在冰浴中研 4 分) 0.4 及 pH 7.4 磷酸緩衝液。全量 1.0 ml 37° 60'。

GOA：0.4 M 谷氨酸 0.1, 0.02 M MgCl_2 0.1, 全量 1.0, 在 37° 瓦氏呼吸器上振盪培養。

GAT：0.4 M α 酮戊二酸 0.2, 0.2 M 天冬氨酸 0.2, 全量 1.0, 37° 60'。

抗腫瘤藥物的研究

IV. 抗腫瘤藥對瘤細胞呼吸及酵解的影響

韓 銳 雷海鵬

(中國醫學科學院藥物研究所藥理學系, 北京)

不少學者認為腫瘤的惡性生長可以看做是瘤細胞藉呼吸及酵解產生的能量，進行旺盛的核酸及蛋白質合成的過程。果然如此，則抗腫瘤藥的作用機制是否包含其對腫瘤細胞呼吸、酵解的影響，將是一個值得探索的問題。本文報告 *N*-甲酰溶肉瘤素等五種抗腫瘤藥對大鼠吉田腹水肉瘤及艾氏腹水癌細胞呼吸，有氧及無氧酵解的影響。

實驗動物為本院總動物房繁殖的雜種動物。腫瘤的接種方法與作者以前報告相同。細胞呼吸的測定採用 Warburg 標準檢壓法。體外給藥時，將藥液放入呼吸瓶的側室、平衡溫度後，將藥液倒入主室；對照瓶的側室內不加藥液，而加入等量的生理鹽水。體內給藥時，所用劑量與同時進行的治療實驗一致。給藥途徑決定於藥物的理化性質，如溶於水則做皮下注射，否則用 2.5% 桃膠做成懸液經口喂藥。一般於接種腫瘤後第五天一次給藥，給藥後一小時測定耗氧量，並計算每毫升瘤細胞 (乾重) 每小時之呼吸率 (Q_{O_2})。有氧及無氧酵解之測定：首先將瘤細胞在 Warburg 裝置中溫孵一小時，取出呼吸瓶後按 Barker 及 Summerson 法測定有氧及無氧條件下的乳酸產量。計算時將乳酸量換算成在重碳酸鹽緩衝液中放出之二氧化碳量；以 $Q_{O_2}^{\%}$ 表示有氧酵解率，以 $Q_{L}^{\%}$ 表示無氧酵解率。

試驗結果表明，體外給藥時氧化氮芥 (Nitromin) 每毫升 100 微克對艾氏腹水癌細胞的呼吸有明顯抑制作用，而對吉田腹水肉瘤細胞的呼吸、有氧及無氧酵解率無明顯影響。溶肉瘤素 (Sarcocysine) 每毫升 100 微克對吉田腹水肉瘤及艾氏腹水癌細胞的上述

代謝皆無明顯影響。

體內給藥時，每公斤 7 毫克之溶肉瘤素對吉田腹水肉瘤細胞的上述代謝也無明顯影響。N-甲酰溶肉瘤素(N-formylsarcolysine, 簡稱 N-甲)與溶肉瘤素不同，在每公斤 100 毫克的劑量下徑口一次給藥顯著促進瘤細胞之呼吸，而對有氧及無氧酵解無明顯影響。N-甲酰溶肉瘤素酰苯丙氨酸乙酯(N-formylsarcolysine phenylalanine, 簡稱 FSPA)每公斤 800 毫克顯著抑制吉田腹水肉瘤細胞的無氧酵解，對呼吸及有氧酵解却無明顯影響。6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine, 簡稱 6-MP)在每公斤 200 毫克的劑量下顯著抑制吉田腹水肉瘤細胞的無氧酵解，對呼吸及有氧酵解却無明顯抑制作用。

治療試驗表明，氧化氮芥、溶肉瘤素，N-甲，FSPA 皆可使吉田腹水肉瘤大鼠的生命比對照組顯著延長，並使部分動物不生腫瘤。6-MP 的治療效果不及氮芥衍生物，每公斤 200 毫克時使腫瘤動物的生命比對照組動物只延長 4 天，且全部動物皆長腫瘤。

關於抗腫瘤藥對瘤組織呼吸及酵解的影響文獻上已有一些報告，但是由於不同作者所用劑量及材料各不相同所得結果很難互相比較。早川及松森報告氧化氮芥顯著抑制動物肝、脾及腦的耗氧量。但是廣田却報告氧化氮芥對人胃癌組織呼吸無影響，而輕度抑制酵解。我們的實驗結果與 Toshiaki 及 Kurosu 的結果基本一致，即每毫升 100 微克的氧化氮芥對吉田腹水肉瘤細胞的呼吸、有氧及無氧酵解無顯著影響，而對艾氏腹水癌細胞的呼吸有明顯抑制作用；不同的是我們未能證明氧化氮芥對酵解的抑制作用。這種差異的產生有三種可能：首先是藥品來源不同；其次測定酵解的方法不同；再次判斷效果的依據也不一致。上述作者以抑制率的表面值作為依據，所得數據未做統計處理。此外有報告指出，酵解之檢壓間接測定不能排除因其他機制或其他有機酸引起二氧化碳釋放的可能。

我們的實驗表明，治療量的溶肉瘤素在給藥 24 小時後對吉田腹水肉瘤細胞的呼吸、有氧及無氧酵解皆無明顯影響。最近 Горожанская 也報告，給接種肉瘤 45 的大鼠以治療量的溶肉瘤素後 24 小時呼吸與酵解仍未受影響。

Mihich 等曾報告，每日給肉瘤 180 小鼠 6-巯基嘌呤 50 毫克/公斤連續 7 天，顯著抑制瘤組織呼吸及無氧酵解，而對正常組織(肝、腎)代謝無明顯影響。我們的實驗條件與上雖有不同，也證明 6-巯基嘌呤顯著抑制吉田腹水肉瘤細胞的無氧酵解。

從上述試驗結果看來，不同抗腫瘤藥對瘤細胞呼吸、有氧及無氧酵解的影響互有不同，即或同一類型溶肉瘤素衍生物的作用也不完全一致。看來，藥物對動物腫瘤的療效與對代謝的影響間的相關問題並無一定規律。值得注意的是：我們所試的五種藥物中不論是臨床常用抗腫瘤藥，還是抗腫瘤新藥都對 Warburg 及 Burk 譽為腫瘤代謝特點的有氧酵解無明顯影響。

正常人血清脂蛋白及其分子中胆固醇 和磷脂的含量與比值

楊可瑩 王金榮 高玉印 袁必遂 魏春軒

(西安第二醫學院生化教研組)

作者用紙上電泳法作了血清脂蛋白的分離工作。在測定 α 及 β 脂蛋白相對含量的同時,也測定了 α 及 β 脂蛋白分子中胆固醇和磷脂的含量。藉以了解我國正常人上述各項的生理數值,並進一步探討與年齡、性別的關係,和 α 及 β 脂蛋白相對含量不同時,分子中胆固醇與磷脂的組成情況,以供研究某些病理狀態時的參考。

脂蛋白的紙上電泳分離及其分子中胆固醇和磷脂的提取與測定,均採用李健齋氏使用的方法。作者在工作的過程中發現用直徑2.5厘米的大試管提取胆固醇時,可基本上避免呈色時氣泡的產生,使比色工作得以順利進行。在磷脂測定中將呈色反應時的溫度由室溫改在90—100°C的水浴中五分鐘,即在流水下冷卻,然後移至室溫靜置10—20分鐘,再行比色,可大為提高顏色的深度。因此,血清的用量由0.12毫升降低到0.04毫升,使用的濾紙由三條減少到一條。測定工作就是在這樣的方法下進行的。

測定的對象為本市中心血庫的獻血者,年齡自21—47歲(男21—47,女20—42),共115人(男73,女42)。

血清脂蛋白及其分子中胆固醇和磷脂的含量及其比值測定的結果是:

(一)我國正常人血清中 α 脂蛋白佔總脂蛋白的29.74%, β 脂蛋白佔70.26 \pm 0.69%。

(二) α 脂蛋白中胆固醇含量平均為65.1 \pm 3.33毫克%、磷脂為81.01 \pm 2.19毫克%、比值為0.89, β 脂蛋白中胆固醇為168.8 \pm 4.91毫克%、磷脂為76.69 \pm 1.81毫克%、比值為2.39 \pm 0.107。

(三) α 及 β 脂蛋白中磷脂含量較為接近。

按不同年齡、性別進一步比較上述各項數值時,除男性21—30歲與31—40歲間 β 脂蛋白中磷脂增高($t=2.62$, 5% $>P>1\%$)及胆、磷比值下降($t=2.2$, 5% $>P>1\%$)和31—40歲與41—47歲間 β 脂蛋白中胆、磷比值下降($t=5.8$, $P<1\%$)具有顯著性外,其餘均不明顯。同樣,女性除21—30歲和31—40歲間 β 脂蛋白中磷脂增高($t=2.2$, 5% $>P>1\%$)及胆、磷比值下降($t=2.3$, 5% $>P>1\%$)較為顯著外,其餘也不明顯。

按不同年齡、性別進一步比較 α 、 β 脂蛋白中胆固醇和磷脂的總量時,看出:

(一) α 和 β 脂蛋白中胆固醇的總量在男性中有隨年齡的增高而下降的趨勢,唯無統計學上的意義。在女性中則無此變化。

(二) α 和 β 脂蛋白中磷脂的總量無論男女均有隨年齡的增高而增高的現象。但以男性21—30歲和31—40歲間磷脂總量的增高($t=2.24$, 5% $>P>1\%$)和胆、磷比值的下降($t=2.3$, 5% $>P>1\%$)較顯著外,其餘不明顯。

此外,按 α 及 β 脂蛋白的不同相對含量進一步比較分子中胆固醇和磷脂的含量時,

看出：

(一) α 脂蛋白含量不同時，磷脂的含量隨 α 脂蛋白含量的減低而減低， β 脂蛋白含量不同時，膽固醇的含量隨 β 脂蛋白的增高而增高。

(二) 但在 α 脂蛋白中膽固醇和 β 脂蛋白中的磷脂則無此規律性的變化。

綜合以上結果，可以看出，在測定的對象中：

(一) 血清脂蛋白的含量，在 21—47 歲間不論男女與年齡無明顯關係。

(二) α 脂蛋白中膽固醇低於磷脂， β 脂蛋白中膽固醇高於磷脂。

(三) α 及 β 脂蛋白中磷脂含量較為接近。

(四) 不論男女年齡自 21 到 30 歲和 31 到 40 歲時血清 β 脂蛋白中的磷脂均有較顯著的增高，而 β 脂蛋白中膽、磷比值有顯著下降外，其餘均不明顯。

(五) 當 α 及 β 脂蛋白相對含量不同時，磷脂在 α 脂蛋白中隨着含量的減少而減少，膽固醇在 β 脂蛋白中隨着含量的增高而增高，其他無規律性變化。

分析的結果，脂蛋白分子中磷脂的含量與李氏的相同，但膽固醇的含量較李氏的為高，因此其比值也高於李氏的結果。

我國正常人血清膽碱酯酶活力的測定

李 增 烈

(西安第二醫學院生化教研組)

根據近年的研究，血清膽碱酯酶活力在許多疾病時都發生明顯的改變。測定此酶活力不僅對疾病的診斷，療效及預後的觀察極有參考價值，而且對於機體植物神經系統機能狀態的瞭解也是一個可利用的指標。

作者對 Metcalf 氏基於測定反應剩餘乙酰胆碱的酶活力測定法作了某些探討。並測定了 203 名正常人血清膽碱酯酶活力。反應的基本原理是利用乙酰胆碱與羥胺形成乙酰異羥胺，在酸性溶液中後者與三價鐵離子形成紅褐色絡合物，其色澤深度與所有的乙酰胆碱成正比。酶活力單位以 1 毫升血清在 37°C 時 1 小時水解的乙酰胆碱微克分子數來表示。

實驗表明下列因素對酶活力的測定有影響：

1) 鹽酸羥胺濃度在 1.5—1.8 M 範圍內變化時對呈色影響較小，但在 2.0 M 附近雖濃度變化很小對呈色影響較大。基質濃度愈大，鹽酸羥胺濃度改變產生的影響愈明顯。

2) 呈色後色澤不穩定，隨時間逐漸消褪，尤以呈色後 10—20 分鐘內變化最大。

3) 利用不同人的血清在同一條件下所作的對照管數值相同，故用此法進行分析工作時，可以同時進行多份標本的測定，無需每份標本作對照。

4) 血清放置於 4°C 冰箱中 24—48 小時能使酶活力降低，故在採取標本分離血清後應立即進行測定。

應用此法並注意控制上述條件，作者對 203 名正常人（其中男性 142 人，年齡自 21 至 47 歲；女性 61 人，年齡自 20 歲至 39 歲）酶活力進行了測定。標本全部取自西安中心血庫獻血員，經過一般體檢，特別注意無黃疸，肝脾不腫大，血色素在 75% 以上。結果：20—29 歲年齡組中男性 40 名酶活力平均值為 106.5 ± 34.6 ；女性 35 名為 132.2 ± 53.0 。30—39 歲年齡組中 63 名男性酶活力平均值為 106.5 ± 34.7 ；26 名女性平均值為 120.4 ± 51.2 。40—47 歲年齡組中 39 名男性酶活力平均值為 103.3 ± 36.3 。僅依性別分類，男性酶活力平均值為 107.6 ± 34.1 ；女性為 127.2 ± 52.6 。203 名總的平均值為 112.1 ± 42.2 。

由上述結果可見：

1) 在 20—47 歲年齡範圍內，男性酶活力不隨年齡變化；女性 20—29 歲組雖較 30—39 歲組為高，但經統計學處理並無顯著性 ($t=0.85, P>5\%$)。

2) 同年齡組男、女酶活力相比，總的看女性較男性為高；有顯著性 ($t=2.1, 5\%>P>1\%$)；30—39 歲組差別不顯著 ($t=1.5, P>5\%$)；20—29 歲組差別明顯 ($t=2.7, 5\%>P>1\%$)。

3) 女性酶活力變動範圍較男性為大。

4) 血清膽碱酯酶活力個體差異較大。

性別的差異見於 Plam (1960) 的報告；酶活力值與 Meulendijk (1961) 所得者近似。

高血壓患者及經氣功藥物綜合治療前後 血清脂蛋白及胆碱酯酶活力的觀察

楊可瑩 袁必遂 魏春軒 王金榮

(西安第二醫學院生化教研組)

高血壓病是一種較為常見的疾病，同時也是極頑固的疾病。長時期以來，對於它的發病機制一直不了解，在臨床方面也沒有找到一個有效的降壓方法。近年來以氣功為主的綜合療法，無論在療效上，抑或在療效的鞏固上均已取得了一定的成就。這就給臨床實踐和理論研究提出了新的任務。從現有的文獻材料中已有不少有關這方面的研究報導，但有關生化方面的研究尚不多見。為了從各方面探討原因，作者從生化方面也作了分析，主要是分析了高血壓病人血清脂蛋白和脂蛋白分子中胆固醇與磷脂的含量，血清胆碱酯酶的活性，以及高血壓患者經過綜合治療前後上述各項的變化情況。

血清脂蛋白及其分子中胆固醇，磷脂和血清胆碱酯酶活性的測定方法，已在作者與李增烈等所作的正常人血清脂蛋白及其分子中胆固醇和磷脂的含量及比值和我國正常人血清胆碱酯酶活力的測定（均未發表）中述及。

研究的對象共有 68 人（男 58，女 10），患者均為原發性高血壓，並在本市中心醫院住院治療的病人。其平均血壓是：入院時收縮壓 150—220 毫米汞柱，舒張壓 95—160 毫米

汞柱；出院時收縮壓 100—160 毫米汞柱，舒張壓 60—110 毫米汞柱。血液標本均在早飯前空腹時抽取。氣功藥物綜合治療前後的分析是取其中的 23—27 例，經過一個療程（21 天）的病人。

患者血清膽鹼酯酶和脂蛋白與正常人分析比較的結果是：

（一）患者血清膽鹼酯酶活力單位較正常人顯著增高（患者 152.50 ± 5.86 ，正常人 112.1 ± 2.97 ）。

（二）患者 β 脂蛋白百分含量和 α 、 β 脂蛋白中的磷脂，及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中磷脂的總量，均較正常人有明顯的增高（患者依次為 74.09 ± 0.76 ， 102.4 ± 7.48 ， 128.49 ± 8.43 ， 213.1 ± 8.46 ；正常人依次為 70.26 ± 0.69 ， 81.0 ± 2.19 ， 76.69 ± 1.81 ， 157.2 ± 3.71 ）。

（三）患者 α 、 β 及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中膽固醇則均較正常人有顯著的降低（患者依次為 40.5 ± 2.70 ， 112.10 ± 7.51 ， 150.5 ± 9.52 ；正常人 65.1 ± 3.33 ， 168.8 ± 4.91 ， 230.5 ± 6.55 ）。

（四）患者 α 、 β 及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中膽，磷比值均較正常人降低（患者依次為 0.54 ± 0.052 ， 0.93 ± 0.07 ， 0.73 ± 0.054 ；正常人 0.94 ± 0.06 ， 2.39 ± 0.107 ， 1.60 ± 0.066 ）。

按高血壓病患者不同含量的 α 及 β 脂蛋白，進一步比較分子中膽固醇與磷脂時，除患者血清 β 脂蛋白中的膽固醇也隨 β 脂蛋白百分含量的增高而增高外，其餘無規律性變化。

患者經氣功藥物綜合治療前後分析比較的結果是：

（一）患者血清膽鹼酯酶活力單位由原來較正常人顯著增高的狀態有了明顯下降，與正常值接近（治療前 142.04，治療後 116.06）。

（二） α 、 β 及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中的磷脂均有下降，但不具統計意義（治療前 α 101.37； β 146.10； $\alpha + \beta$ 251.35。治療後 α 93.18； β 109.21； $\alpha + \beta$ 199.80）。

（三） β 及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中的磷脂下降雖不顯著，但此兩部分中膽，磷比值則由原來較正常人明顯降低的狀況下，有了較顯著的增高（治療前 β 0.84； $\alpha + \beta$ 0.64，治療後 β 1.14； $\alpha + \beta$ 0.85），但仍低於正常人。

按患者經氣功藥物綜合治療前後不同含量的 α 及 β 脂蛋白，進一步比較其分子中膽固醇和磷脂時，除 β 脂蛋白分子中的磷脂均有不同程度的下降外，其餘均不規律。

綜合上述結果，可以看出：高血壓病人血清膽鹼酯酶，脂蛋白，及其分子中膽固醇和磷脂以及膽，磷的比值均與正常人不同。其中膽固醇在 α 、 β 中的分佈及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中的總量均低於正常人和文獻報告的數值，血清膽鹼酯酶， β 脂蛋白， α 、 β 及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白中的磷脂均顯著增高，三者中膽，磷比值皆顯著下降。經氣功藥物綜合治療後，在血壓下降的情況下，血清膽鹼酯酶的異常情況有了顯著的恢復， β 脂蛋白分子中及 $\alpha + \beta$ 脂蛋白分子中膽，磷比值亦有顯著的改進。通過上述現象，初步認為以氣功為主的降壓方法不僅作用於血壓方面的變化，同時對機體的某些生化改變也起了一定的影響。氣功療法的許多方面的作用，對高血壓病的神經源學說有着愈來愈多的支持意義，但高血壓病是很複雜的，僅依據現在的一些研究結果，尚不能闡明其原因，有待於多方面的繼續研究，才能找出實質上的原因。

廣西地區蛇毒生化研究 I.

三種蛇毒三種酶活性的初步觀察

魏琦 梁熙南 王松江 黎秀芳

(廣西醫學院蛇毒研究專題組*)

中國大陸的蛇毒研究報導頗少,有關生化資料甚至闕如。我們蛇毒研究專題組近年來曾將廣西僮族自治區所產七種毒蛇,共 16000 餘條進行蛇毒研究;本文擬將其中三種蛇毒:中華眼鏡蛇毒(Venom of *Naja naja atra*, Chinese Cobra),眼鏡王蛇毒(Venom of *Naja hannah*, King Cobra)及金環蛇毒(Venom of *Bungarus fasciatus*, Banded Krait)的乙酰胆鹼酯酶(AChE)、卵磷脂酶(包括直接溶血與間接溶血作用)及對酵母 RNA 水解的酶活性進行觀察及比較,初步得出下列結果:

一、廣西三種蛇毒的 AChE 活性: 用 Warburg 氏呼吸計氣壓法測定,結果三種蛇毒均具有乙酰胆鹼酯酶活性,酶活性大小順序為:金環蛇毒($Q_{AChE} b_{30}$ 5819 微升 CO_2 /毫克乾蛇毒),中華眼鏡蛇毒($Q_{AChE} b_{30}$ 884 微升 CO_2 /毫克乾蛇毒),眼鏡王蛇毒($Q_{AChE} b_{30}$ 437 微升 CO_2 /毫克乾蛇毒);其結果與各學者報導一致。原蛇毒的 AChE 活性與小白鼠急性毒性(半致死量)不成並列關係。(毒性大小順序為:眼鏡王蛇毒,中華眼鏡蛇毒,金環蛇毒。)此或由於毒性是各種有毒物質對機體作用的綜合結果,而非單一酶的作用。

二、廣西三種蛇毒的卵磷脂酶活性: 離體試管中對不同動物(豚鼠、小白鼠、家兔)紅血球混懸液的直接溶血和間接溶血作用方面,用溶血百分率和溶血百分率之差值作為指標,探討其溶血現象。三種蛇毒直接溶血和間接溶血的結果是不一致的:

(1) 三種蛇毒不同濃度對小白鼠血球的直接溶血,隨着蛇毒濃度的增加而溶血百分率亦隨之增加,但三種蛇毒各呈不同的“S”狀曲綫。在蛇毒一定濃度範圍內,金環蛇毒溶血較強(溶血百分率 50% [下同]的蛇毒濃度為 3.93 毫克/毫升),眼鏡王蛇毒次之(7.88 毫克/毫升),中華眼鏡蛇毒較弱(9.75 毫克/毫升)。

(2) 中華眼鏡蛇毒對不同動物如豚鼠、小白鼠和家兔血球的直接溶血強度是不同的,豚鼠溶血最強,家兔與小白鼠較弱。

(3) 中華眼鏡蛇毒對不同濃度低滲 NaCl 溶液中的家兔血球的直接溶血,發現溶血百分率有不同程度的影響,其中以 0.48% NaCl 最為顯著,未加蛇毒的溶血百分率之差值為 53%,加了蛇毒增達 71.2%;因此不能排除蛇毒對滲透性溶血的影響。

(4) 三種蛇毒不同濃度與一定量(0.02 毫克/毫升)純粹卵磷脂作用後,對小白鼠紅血球的間接溶血比直接溶血要強,與過去學者認為是卵磷脂酶活性的實驗符合;但三種蛇毒間接溶血百分率曲綫各有不同:金環蛇毒隨着濃度增加而溶血百分率呈直綫上升;中華眼鏡蛇毒在某一濃度範圍內(0.375 毫克/毫升—1.5 毫克/毫升)亦呈直綫上升,倘再增高其濃度,則溶血百分率反而下降;眼鏡王蛇毒濃度增加,其溶血百分率開始增加甚為緩慢,

* 廣西醫學院蛇毒研究專題組由本院藥理教研組與生化教研組組成。

蛇毒濃度到 3.0 毫克/毫升後才急劇增加。

三、三種蛇毒對酵母 RNA 的酶促反應：仿效 Radomoski 測定法測定同一濃度 (3.75 毫克/毫升) 的三種蛇毒溶液各對三種不同濃度的酵母 RNA (英 B. DH 製品) 基質溶液 (60 毫克/毫升) 40 毫克/毫升及 20 毫克/毫升) 作用, 在保溫 37°C 下, 用 Beckman Model G 型酸度計每 10 分鐘測定 pH 一次, 以 Δ pH 的改變觀察三種蛇毒對 RNA 水解產生酸性物質情形, 結果:

(1) 三種蛇毒均能水解酵母 RNA。

(2) Δ pH 改變大小, 三種基質濃度中, 在一小時內都以中華眼鏡蛇毒最大, 金環蛇毒及眼鏡王蛇毒較小。

(3) 反應物質的原始酸鹼度調節至 pH 6 和 8 左右時, Δ pH 的改變以 pH 8 左右較大, 因而蛇毒分解 RNA 的酶活力的最適宜 pH 與各學者報導大約在 7.5 是接近的。

此外, 三種蛇毒曾用紙上電泳及 Antiweiler 自由電泳分析, 發現三種蛇毒多屬鹼性蛋白質, 有少量酸性蛋白質, 其中中華眼鏡蛇毒含七種主要蛋白質, 金環蛇毒含三種主要蛋白質, 眼鏡王蛇毒含七種主要蛋白質, 紙上電泳與 Antiweiler 自由電泳結果大同小異。

皮質醇對肝臟中谷-丙轉氨基酶 作用的研究

李韻笙 朱伯明 陳明璧

(重慶醫學院生化教研室)

已知皮質醇能促進肝中糖元的儲存和谷-丙轉氨基酶的活性以及尿中氮排出量的增多。可是, 這些效應間如何相互聯系尚須進一步研究。為此, 我們企圖探討在一定條件下, 大白鼠注射皮質醇後, 肝臟中谷-丙轉氨基酶活性和尿中氮排出量的關係, 以及口服葡萄糖對以上效應的影響。

我們選用同種雄性大白鼠 60 只, 分兩批進行實驗。第一批, 用體重 80—120 克的動物 20 只, 平均四組: 第一二組, 每鼠每天一次由皮下注射皮質醇 1 毫升 (0.5 或 5 mg), 連續四天; 第三組, 不注射皮質醇, 禁食 48 小時; 第四組, 注射生理鹽水代替皮質醇, 作為對照。用 Tonhazy 等氏法測定肝中谷-丙轉氨基酶活性, 開氏法測定肝蛋白氮, Kemp 等氏法測定肝糖元。稱量體重、肝重、肝中水分。比較它們的差異。第二批, 用體重 140—180 克的動物 40 只, 平分四組。各組均在空腹 4 小時後, 進行以下實驗: 第一組, 一次由皮下注射皮質醇 1 毫升 (5 mg), 繼續空腹 24 小時; 第二組, 注射生理鹽水 1 毫升, 口服葡萄糖約 10 克; 第三組, 注射皮質醇 1 毫升 (5 mg), 再口服葡萄糖約 10 克; 第四組, 注射生理鹽水 1 毫升, 繼續空腹 24 小時, 作為對照。測定上列指標及尿中氮排出量。

第一批實驗結果:

表1 注射皮質醇後大白鼠的體重、肝重、肝中水分、蛋白質及糖元含量的平均值與對照動物比較

| 動物處理 | 體 重 (克) | | 新鮮肝重 (克) | 肝佔體重 (%) | 水 重 (%) | 蛋 白 質 (%) | 糖 元 (%) |
|------------------|---------|------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| | 始 重 | 增 減 | | | | | |
| 對 照 | 81 | +2.4 | 3.9 | 4.5 | 72.3 | 19.0 | 0.52 |
| 注射激素 (5 mg×4) | 98 | -9.8 | 5.1 | 5.7 | 70.8 | 18.8 | 7.22 |

表2 注射不同劑量皮質醇及禁食後大白鼠肝中谷-丙轉氨基酶活性與對照動物比較

| 動物處理 | 酶 活 性 | |
|--------------------|---------------------------|-------------------|
| | μ moles 丙酮酸/小時/mg 蛋白質 | 全肝 m moles 丙酮酸/小時 |
| 注射激素 (0.5 mg×4) | 732 ± 133 | 111.0 ± 16.0 |
| 注射激素 (5 mg×4) | 978 ± 300 | 148.0 ± 36.7 |
| 禁 食 | 713 ± 378 | 94.5 ± 35.9 |
| 對 照 | 476 ± 163 | 52.8 ± 15.6 |

由表1、表2可見：(一)大白鼠每天一次注射皮質醇5毫克，連續四天，體重減輕。肝重、肝糖元含量及肝中谷-丙轉氨基酶活性均有顯著增加。每天一次注射皮質醇0.5毫克，連續四天，谷-丙轉氨基酶活性也有一定程度的增加。(二)禁食48小時，肝中谷-丙轉氨基酶活性也增高，但是個體差異很大。

第二批實驗結果：

表3 注射皮質醇、口服葡萄糖及二者並用後大白鼠肝重、肝蛋白氮又糖元含量的改變

| 動物處理 項 目 | 空腹注射激素 | 吃 葡 萄 糖 | 吃糖注射激素 | 空腹 28 小時 |
|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 肝 重 (gm) | 5.44 ± 0.56 (10) | 6.01 ± 0.96 (9) | 7.64 ± 0.80 (10) | 4.85 ± 0.62 (11) |
| 肝 蛋 白 氮 (mg/gm 鮮肝) | 32.10 ± 5.00 (7) | 27.70 ± 3.51 (9) | 26.09 ± 3.75 (8) | 34.04 ± 2.67 (11) |
| 全肝蛋白氮 (mg) | 167.0 ± 29.2 (10) | 180.0 ± 23.0 (7) | 169.9 ± 29.2 (9) | 198.1 ± 33.4 (8) |
| 肝 糖 元 (%) | 0.51 ± 0.43 (9) | 0.70 ± 0.36 (9) | 1.40 ± 0.58 (8) | 0.07 ± 0.05 (11) |

表4 注射皮質醇、口服葡萄糖及二者並用後對大白鼠肝中
谷-丙轉氨基酶活性及尿中氮排出量的影響

| 動物處理 | | 空腹注射激素 | 吃葡萄糖 | 吃糖注射激素 | 空腹28小時 |
|-------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 肝中酶活性 | μ moles 丙酮酸/小時 /mg 蛋白氮 | 870 \pm 207 (8) | 509 \pm 171 (9) | 892 \pm 266 (8) | 626 \pm 93.7 (11) |
| | 全 肝 m moles 丙酮酸/小時 | 144.6 \pm 15.3 (10) | 83.4 \pm 32.6 (9) | 170.2 \pm 51.9 (8) | 104.5 \pm 23.9 (11) |
| | 尿氮排出量 (mg N/24小時) | 152 \pm 35.5 (9) | 75.4 \pm 20.1 (9) | 143 \pm 23.2 (7) | 107 \pm 17.2 (4) |

註：1. 激素指皮質醇 2. 括弧內指動物數

由表3、表4可見：(一)一次注射皮質醇5毫克後，肝重、肝糖元含量及肝中谷-丙轉氨基酶活性亦有顯著增加；尿中氮排量顯著增加。肝中蛋白氮總量沒有明顯改變。(二)大白鼠喂飼葡萄糖後，肝重及肝糖元含量顯著增加。尿中氮排量明顯減少。肝中谷-丙轉氨基酶活性也有不同程度的下降。(三)大白鼠注射皮質醇並飼以葡萄糖後，肝重及肝糖元含量、肝中谷-丙轉氨基酶活性及尿中氮排量均有顯著增加。但與僅僅注射皮質醇組比較，肝中谷-丙轉氨基酶活性及尿氮排出量的增加程度並無差異，而肝重及肝糖元則增加得更顯著。

總的結果指出：皮質醇能引起大白鼠體重減輕，肝糖元含量、肝中谷-丙轉氨基酶活性及尿氮排出量均增加。而大白鼠在只飼以葡萄糖後，尿氮排出量減少，肝中谷-丙轉氨基酶活性亦有不同程度的下降。提示了該酶的活性可能和蛋白質分解及糖元異生作用有關。但注射皮質醇並口服葡萄糖的動物和只注射皮質醇組比較，肝中谷-丙轉氨基酶活性和尿中氮排出量二項都無差別。其原因尚待探討。此外，空腹大白鼠經注射皮質醇後，肝糖元增加，肝重亦增大。注射皮質醇再口服葡萄糖組肝糖元含量最多，肝也最重。各組肝蛋白氮無明顯變化。可見肝大與糖元儲存有較大關係，而不是由於蛋白質總量的變化。

主要參考文獻

- [1] Engel, F. L.: *Endocrinology*, 49, 171, 1949.
- [2] Brin, M. and Mckee, R. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 61, 334, 1956.
- [3] Beaton, G. H., Curry, D. M. and Veen, M. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 288, 1957.
- [4] Gavosto, F., Pileri, A. and Brusca, A.: *Biochem. Biophys. Acta*, 24, 250, 1957.
- [5] Rosen, F. et al: *Science*, 127: 3273, 287, 1958.
- [6] Rosen, F., Roberts, N. R., Budnick, L. E. and Nichol, C. A.: *Endocrinology*, 65: 2, 256, 1959.
- [7] Rosen, F., Roberts, N. R. and Nichol, C. A.: *J. Biol. Chem.*, 234: 3, 476, 1959.
- [8] Harding, H. R., Rosen, F. and Nichol, C. A.: *Am. J. Physiol.*, 201: 2, 271, 1961.

偶氮染料對大鼠肝色氨酸吡咯酶底物 誘導的影響及其機制的研究

李士諤 譚潤生 賈錫安*

(中國醫學科學院實驗醫學研究所生物化學系,北京)

大鼠肝內色氨酸吡咯酶 (TP) 可因注射底物 (色氨酸) 而誘導。但在肝癌組織 (如 Novikoff 肝癌) 中則無此種誘導能力。Fiala 和 Fiala^[1] 首先觀察到在 3'-甲基-2,4-二甲基氨基偶氮苯 (3' MeDAB) 誘發肝癌早期, TP 的誘導即受到抑制。在本實驗進行過程中, 相繼出現與 Fiala 等相似的報導。但是對於這些影響的機制則很少研究。

本實驗首先觀察到在 3' MeDAB 誘發的肝癌組織中, TP 的底物誘導 (注射 DL-色氨酸, 1 毫克/克鼠重, 誘導 5 小時) 較正常肝大為降低, 在個別動物的肝癌中幾乎完全消失, 這和 Chan 等^[2] 最近報導的結果相似。在 3' MeDAB 引癌過程中, 如喂 3' MeDAB 13 天, 33 天, 90 天肝中 TP 的底物誘導較對照肝顯著降低。此與 Fiala 和 Fiala^[1], Kizer^[3] 的結果相似。急性注射 3' MeDAB 24 小時也引起 TP 的底物誘導顯著降低。切除腎上腺後, 亦得到同樣結果。這些都充分證明致癌物, 3' MeDAB 具有抑制底物誘導 TP 的作用。

但是無論在慢性試驗或急性試驗的條件下, 非致癌物, 2 MeDAB, 都具有與 3' MeDAB 相似的作用。看來 3' MeDAB 對於影響底物誘導 TP 的作用不是特異性的。但是考慮到 2 MeDAB 不能引起肝癌, 其對於肝臟代謝 (如酶活性) 的影響, 可因停止喂 2 MeDAB 而恢復, 而 3' MeDAB 的影響則不能恢復, 因此, 2 MeDAB 與 3' MeDAB 雖然對於 TP 的底物誘導有相似的影響, 但二者的機制可能不同。

TP 活性主要分佈於肝細胞上清液, 微粒體無 TP 活性。當喂過 3' MeDAB 的大鼠肝細胞上清液與對照組大鼠肝細胞上清液以不同比例混合後, 所測得的 TP 活性與二者單獨的活性之和相同, 說明 3' MeDAB 沒有因底物誘導而產生任何抑制物或激活物。同樣, 2 MeDAB 組的結果也是如此。

TP 活性需要輔助因子 (hemin 類物質) 的參與。Fiegelson 等^[4] 證明微粒體具有激活上清液 TP 活性的作用。因此我們進行了微粒體與上清液的加合實驗, 結果發現:

(1) 3' MeDAB 組大鼠肝微粒體激活上清液 TP 活性的作用較對照組的差, 而對於微粒體的激活因子的結構 (吸收光譜) 無影響。在相同條件下, 2 MeDAB 組的微粒體則與對照組的相似。

(2) 微粒體對於激活 3' MeDAB 組上清液 (未誘導的) TP 活性的作用與對於激活對照組上清液 TP 活性的作用相似, 說明 3' MeDAB 對於 TP 本身似無破壞作用。2 MeDAB 亦是如此。

(3) 3' MeDAB 抑制底物誘導 TP 的作用, 可能是主要由於 3' MeDAB 抑制 TP

* 現在通訊處: 西安醫學院生化教研組。

蛋白的誘導生成以致 TP 蛋白減少的原故,因為加入微粒體後,上清液 TP 活性只是略有增加。2 MeDAB 雖然也使 TP 的底物誘導降低,但是當加入微粒體後,上清液 TP 活性的升高非常顯著。說明 2 MeDAB 的作用,可能是主要由於阻礙了 TP 的激活,而不是抑制 TP 蛋白的誘導生成。

此外, Greengard 等^[5]曾證明注射色氨酸二小時的誘導現象主要是由於 TP 的激活,而不是由於 TP 蛋白的誘導生成。本試驗進一步證明 3' MeDAB 對於色氨酸二小時的誘導無明顯抑制作用,但 2 MeDAB 仍然有明顯的抑制作用。

以上結果說明 3' MeDAB 與 2 MeDAB 對於抑制底物誘導 TP 的作用是通過不同的機制,而 3' MeDAB 可能對於抑制 TP 蛋白的誘導生成的這一特點可能與其致癌作用有關。

主要參考文獻

- [1] Fiala, S. and Fiala, A. E.: Brit. J. Cancr. 13, 236, (1959).
- [2] Chan, S. K., McCay, T. A. and Kizer, D. E.: Cancer. Res. 20, 1303, (1960).
- [3] Kizer, D. E.: J. Natl. Cancer. Inst. 27, 1503, (1961).
- [4] Feigelson, P. and Greengard, O.: J. Biol. Chem. 236, 153, (1961).
- [5] Ibid. 236, 158, (1961).

病毒侵染與寄主植物代謝關係 的初步研究*

田 波 湯佩松*

(中國科學院微生物研究所, 中國科學院植物研究所*, 北京)

初步研究了菸草 (*Nicotiana tabacum* L.) 代謝的某些環節與菸草花葉病毒 (TMV) 和馬鈴薯病毒 X (PVX) 合成的關係。試驗包括呼吸過程中的某些抑制劑和中間產物對病毒增殖的作用, 病毒侵染對寄主細胞中葡萄糖-6-磷酸的酵解與戊糖磷酸途徑的比例改變, 以及對寄主細胞中 DNA、RNA 含量的影響。

(一) 寄主呼吸代謝過程與 TMV 增殖的關係: 將接種 TMV 的離體菸草的半葉浮於某些呼吸抑制劑和中間產物的溶液中, 另半葉浮於相應的溶劑中作為對照; 並以 *N. glutinosa* 上形成的斑點數測定病毒濃度, 得到下列結果:

碘代乙酸 (IAA) 和 NaF 在有氧條件下抑制病毒的合成到對照的 51.1% 和 59.0%。在氮氣 (含 2% 的 O₂) 中分別為 22.2% 和 56.6%。NaF 在 pH 7 時表現出最高的抑制能力, IAA 在 pH 5 時的抑制作用最大。經抑制劑處理過的葉片如用水沖洗後放在蒸餾水內, 則病毒濃度又恢復到對照水平。可見這是一可逆的抑制作用。此抑制作用還可完全被丙酮酸所恢復, 單獨用丙酮酸處理的病毒濃度為對照的 133.1%, 與 IAA 和 NaF 同時

* 周家熾和林傳光教授曾給予熱心的指導。特此致謝。

處理時分別為 144.3% 和 172.8%。

在所測定的 Krebs 循環的酸中蘋果酸和 α -酮戊二酸增加病毒的合成到對照的 148.7% 和 129.6%。琥珀酸、檸檬酸及延胡索酸的作用不顯著。丙二酸抑制病毒的合成到 59.8%。這一抑制部分的為琥珀酸恢復。單獨用琥珀酸處理的病毒量為對照的 99.9%，與丙二酸同時處理時為 84.6%。

在末端氧化抑制劑中 KCN 的抑制作用最顯著，降低病毒濃度到對照的 42.7%， NaN_3 和 Dieca 分別為對照的 73.9% 和 76.7%，氧化磷酸化抑制劑 DNA 抑制到 50.1%。

由以上結果看來，TMV 的合成與寄主呼吸代謝中的基本過程都是密切相關的。

糖酵解和丙酮酸氧化的中間產物供給病毒合成的初步階段以碳水化合物骨架，而末端氧化所產生的高能磷酸鍵則是病毒合成的能源。在我們的試驗條件下磷酸丙糖、丙酮酸、蘋果酸和 α -酮戊二酸以及末端氧化的氧化磷酸化對病毒合成是特別重要的步驟。

(二) **TMV 侵染對寄主葡萄糖酵解與戊糖磷酸途徑的影響：**將接種 TMV 與對照葉圓片（直徑 10 mm）培養在 Hoagland 氏培養液中，於接種後不同時間放入 Warburg 反應瓶中（每瓶 20 片）加入 3 毫升含 9 微居里葡萄糖-1- C^{14} 或葡萄糖-1-6- C^{14} 的 0.1 M 葡萄糖溶液中，在 28°C 黑暗下振盪 2 小時， CO_2 用 KOH 吸收，然後計數 C^{14}O_2 脈衝/分。結果接種與對照葉片都隨了離體後培養時間的延長 $\frac{C_1}{C_1 - C_2}$ 的脈衝比值逐漸減小。即戊糖磷酸途徑較酵解途徑相對減少。在接種後第 1, 2, 4, 6, 8, 10 天，對照的比值為 1.7（脈衝數為 $\frac{180.8}{105.8}$ ），0.88, 0.69, 0.41, 0.17（ $\frac{100.0}{567.8}$ ），0.41。接種 TMV 的較對照為高，分別為 2.32（ $\frac{235.7}{103.8}$ ），1.27, 1.04, 0.53, 0.44（ $\frac{150.0}{336.0}$ ），0.38。這種差別從接種後第一天就表現出來，TMV 為對照的 137%，第八天差別最大達對照的 258%，第十天反較對照稍低。病毒量（*N. glutinosa* 半葉上平均斑點數）接種後各天分別為 11.0、44.0、69.8、106.2、83.8、69.4。接種葉圓片的呼吸強度在第 4、6、8 天較對照稍高，其他時間與對照的水平相近。TMV 感染後戊糖磷酸途徑增加的最高峯在病毒最大量之後，因此其增加與 TMV-RNA 合成的關係尚待進一步研究。

(三) **病毒侵染對寄主核酸含量的影響：**試驗測定了感染 TMV 和 PVX 的葉內 DNA, RNA 含量的變化。DNA 及 RNA 按 Ogur 等 (1952) 和 Holden (1952) 的方法測定。接種葉片的勻漿中 RNA 和 DNA 的分析說明菸草接 TMV 和 PVX 後，核酸含量都有顯著變化。在一系列的變化中，首先是 DNA 含量的增加，接種後第一天就開始上升，至第二天達最高峯。TMV 增至對照的 130%；PVX 增至 120%，第四天又降低到接近對照的水平，其後 RNA 含量開始劇烈增加，至第七天達最高峯，TMV 達對照的 250%；PVX 達 160%。這種先後增加的關係似乎說明病毒 RNA 的合成依賴於寄主細胞中 DNA 的某種變化作為先導。病毒的血清滴度及傳染力的增加不完全與 RNA 的增長相符合。

白地黴 (*Geotrichum Candidum*)

對各種碳源的氧化作用

簡浩然 丁達明 曾雲添 卓中其

(中國科學院武漢微生物研究所)

白地黴是一個世界性分佈並已廣泛應用於微生物食品和飼料工業生產的菌種，近年來國內更普遍應用於菌食品生產。

本工作的目的在於提供生產實踐以一定的生物學依據，並對該菌碳源代謝的特點作初步的探討。

一、方 法

白地黴利用碳源的種類用瓦氏呼吸計常規方法測定。碳源用量均以葡萄糖為準。葡萄糖用量為 0.5 ml 6 mM，其他碳源則按葡萄糖等碳量計算，對於目前尚不能確知其分子量者如肝糖等，其用量則與葡萄糖同。

使用菌種為白地黴 410 株 (*Geotrichum Candidum* 410) 菌種培養基含下列成分： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.56 g, MgSO_4 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, KCl 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 葡萄糖 3 g, 蒸餾水 1000 c.c., pH 5—5.3 菌種以搖床振盪培養 28°C, 17—19 小時收穫，用生理磷酸緩衝溶液離心洗滌兩次，離心後，以基礎培養稀釋製成靜息細胞懸液，冰箱 4°C 保存備用。

基礎培養基即未加葡萄糖的菌種培養基。

二、實 驗 結 果

測定了白地黴氧化四十五種碳源時的氧攝取量，得出加碳源後兩小時的平均 Q_{O_2} ，並以其 Q_{O_2} 超過或低過 5% 者作為能否利用或者是否有抑制作用的標準，實驗表明白地黴能利用其中的 27 種，另 18 種則不被利用，詳細結果列於下表：

Geotrichum Candidum 410 對各種碳源的氧化作用

| 碳源 | Q _{O₂} | | 加碳源 Q _{O₂} / 內源 Q _{O₂} % | 能用否* | 碳源 | Q _{O₂} | | 加碳源 Q _{O₂} / 內源 Q _{O₂} % | 能用否* |
|----------|----------------------------|-------|--|------|----------|----------------------------|-------|--|------|
| | 內源 | 加碳源 | | | | 內源 | 加碳源 | | |
| D-赤蘚糖 | 14.19 | 13.57 | 95.6 | - | 肌 醇 | 6.22 | 6.27 | 100.5 | - |
| D(+)-木糖 | 9.4 | 18.4 | 172.5 | + | 衛 芽 醇 | 6.22 | 6.20 | 99.7 | - |
| D(-)-核糖 | 5.06 | 5.59 | 110.5 | + | 側金盞花醇 | 7.34 | 7.48 | 102.0 | - |
| D-阿拉伯糖 | 7.17 | 7.37 | 102.77 | - | 乳 酸 | 7.34 | 12.3 | 167.2 | + |
| L-阿拉伯糖 | 7.17 | 7.28 | 101.53 | - | 順丁烯二酸 | 11.21 | 11.22 | 100.5 | - |
| L(+)-果糖 | 5.76 | 5.9 | 110.5 | + | 反丁烯二酸 | 11.21 | 17.64 | 174.5 | + |
| D-葡萄糖 | 4.66 | 7.42 | 160.2 | + | D(+)-酒石酸 | 14.19 | 14.61 | 102.9 | - |
| D(-)-甘露糖 | 4.66 | 7.12 | 152.6 | + | D(-)-酒石酸 | 14.19 | 15.29 | 107.7 | + |
| D(+)-牛乳糖 | 9.4 | 15.8 | 168.4 | + | L-丙氨酸 | 9.67 | 18.10 | 187.76 | + |
| D(-)-果糖 | 14.19 | 17.55 | 123.6 | + | D-丙氨酸 | 9.67 | 15.69 | 162.83 | + |
| L(-)-山梨糖 | 9.98 | 10.77 | 108.0 | + | β-丙氨酸 | 9.67 | 10.93 | 113.42 | + |
| 蔗 糖 | 6.64 | 6.61 | 99.4 | - | D-巰氨酸 | 11.46 | 12.69 | 110.51 | + |
| 蜜 二 糖 | 4.93 | 4.91 | 99.6 | - | L-巰氨酸 | 11.46 | 24.65 | 214.65 | + |
| 乳 糖 | 5.66 | 5.61 | 99.0 | - | L-正亮氨酸 | 7.68 | 16.38 | 212.9 | + |
| 海 藻 糖 | 4.93 | 5.17 | 104.8 | - | L-異亮氨酸 | 7.68 | 19.17 | 254.1 | + |
| 松 三 糖 | 9.98 | 11.13 | 111.5 | + | D-亮氨酸 | 7.68 | 8.78 | 114.26 | + |
| 棉 子 糖 | 6.8 | 6.75 | 98.7 | - | L-蛋氨酸 | 7.69 | 11.43 | 148.51 | + |
| 菊 糖 | 9.4 | 9.7 | 102.9 | - | D-蛋氨酸 | 7.69 | 10.94 | 142.12 | + |
| 肝 糖 | 9.98 | 13.37 | 133.9 | + | D-鹽酸組氨酸 | 11.46 | 12.85 | 112.53 | + |
| 水 楊 甙 | 5.66 | 5.67 | 100.1 | - | L-組氨酸鹼 | 11.46 | 11.63 | 101.27 | - |
| 甘 露 醇 | 6.22 | 7.14 | 114.6 | + | L-色氨酸 | 7.69 | 7.40 | 96.2 | - |
| 赤 蘚 醇 | 5.06 | 5.42 | 107.1 | + | D-色氨酸 | 7.69 | 7.57 | 99.07 | - |
| 山 梨 醇 | 5.66 | 6.0 | 106.0 | + | | | | | |

* 圖例：+ 表能用，- 表不能用。

三、討 論

實驗結果指出，就實驗所用材料範圍內，醇類一般難於利用，糖類中二糖和多糖除肝糖外，均不能利用，而單己糖均能利用。戊糖情況比較特殊，四種微小差異的異構物中，L- 和 D- 阿拉伯糖均不能利用，唯木糖作用顯著。D- 和 L- 型的各種氨基酸也有一定差異。

綠豆種子蛋白酶的研 究

朱德煦 蔡幼民

(南京大學生物系)

來自於不同材料的某些重要蛋白水解酶一直是大家所關心而廣泛研究的對象，例如動物胰臟中的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶，植物中的木瓜蛋白酶，細菌中的枯草桿菌蛋白酶等。但對植物種子蛋白酶的研究在文獻上却報導不多，我們從綠豆種子中提取了蛋白酶，並對它的性質作了初步的研究，其專一性和作用機制似乎與以上已知的蛋白酶有所不同，這可能對蛋白水解酶的比較研究提供一些有用的資料。

將綠豆發芽後去豆殼，乳胚製成丙酮粉，用含有 2% NaCl 的 0.1 M pH 7 磷酸緩衝液抽提，然後用硫酸銨，丙酮反覆分級沉澱，最後酶製劑的活力較粗抽提液提高 35 倍，以血紅蛋白為底物，最適作用 pH 為 4.5，而對苯甲酰精氨酸胺的最適 pH 在 5.2 到 6.5 之間， K_m 值為 0.03 M。酶活力對熱較穩定，在作用時間 20 分鐘內，最適溫度為 65°C。

碘代乙酰胺 (10^{-3} M)，半胱氨酸 (10^{-3} M)，和 EDTA (10^{-3} M) 對酶活力均無影響。濃度為 10^{-4} M 的 DFP 能抑制酶活力 40%，當濃度提高至 10^{-2} M，亦僅抑制二分之一的酶活力。因而此酶並不需要金屬離子，亦不需要像木瓜酶一樣要有 -SH 基化合物的激活，同時亦不同於對 DFP 敏感的一些蛋白酶。

用胰島素 B 鏈為底物，酶水解後的產物經 DNP 化後先後用乙醚和乙酸乙酯抽提，結果分成醚溶性，酯溶性和水溶性的 DNP 肽，將此三部分的肽用 5.7 N 鹽酸在 105°C 下水解 24 小時，然後分別用 Sanger 的 DNP 末端技術檢查 N 末端殘基，證明綠豆蛋白酶具有比胃蛋白酶，胰凝乳蛋白酶等更廣的專一性，它能水解一般蛋白水解酶所不易水解的脯氨酸與賴氨酸以及谷氨酸與精氨酸之間的鍵。

氫離子濃度對此酶水解苯甲酰精氨酸胺的影響是屬於競爭性的類型。從 pH 對 K_m 的影響求得此酶活性中心可解離基團的 pK 值為 4.2，因而推測酶蛋白中的殘基可能是此酶與底物結合時所必需的基團。

肽 的 研 究

I. 帶保護基的胰島素 A 鏈氨基端五肽的合成

汪猷 徐杰誠 陸仁榮 黃剛* 黃敬堅

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

本文報告了三種帶不同保護基的胰島素 A 鏈氨基端五肽的合成。它們是 *N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-纈氨酸- γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺(I)、*N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-纈氨酸- γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺酰肼基甲酸叔丁酯(II)和 *N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-纈氨酸-谷氨酸-谷氨酰胺甲酯(III)。五肽 I 是由初次合成的 *N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-纈氨酸(VI)與 γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺(IX)通過羧酸碳酸混合酸酐法,或 VI 的酰肼衍生物與 IX 通過疊氮化物法縮合而成的。五肽 II 是由 VI 與 γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺酰肼基甲酸叔丁酯(XI)經混合酸酐法合成的。五肽 III 則係用活化酯法由谷氨酰胺甲酯的氮端,逐步與相應的 *N*-保護氨基酸對硝基苯酯縮合、延伸而得。

在用混合酸酐法合成五肽 I 中,從反應混合物分離得 *N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-*D*-纈氨酸(XXII)。由 XXII 與 IX 合成了五肽 I 的立體異構體, *N*-苄氧羰基甘氨酸-異亮氨酸-*D*-纈氨酸- γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺(XXIII)。

由 *N*-苄氧羰基- γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺酰肼基甲酸叔丁酯(X)經脫去酰肼基上的保護基後,用疊氮法與 *S*-苄基-半胱氨酸-*S*-苄基-半胱氨酸縮合而得 *N*-苄氧羰基- γ -甲酯-谷氨酸-谷氨酰胺酰肼基-*S*-苄基-半胱氨酸-*S*-苄基-半胱氨酸(四肽 XXV)。

五肽 I、II、III, 四肽 XXV 及其主要的合成中間肽的光學純度均經亮氨酸胺酶、胰凝乳蛋白酶或旋光法檢定。在五肽的酶水解的 pH 等條件下發現有部分的谷氨酰胺和谷氨酸變為四氫吡咯酮-(5)-羧酸-(2),致使這些氨基酸的測定值偏低。

* 中國科學院生物化學研究所研究實習員。

肽 的 研 究

II. 帶保護基的胰島素 A 鏈羧端九肽的合成*

汪 猷 黃敬堅 張偉君 屠傳忠 王志勤
徐元耀 湯永禎 陸蘊華 金善煒 龔嶽亭**

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

本文報導了帶保護基的胰島素 A 鏈羧端九肽 I (*N*-苄氧羰基亮氨酸-酪氨酸-谷氨酸胺酰-亮氨酸- γ -甲酯-谷氨酸-天冬酰-酪氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-天冬酰胺甲酯) 的合成。I 是由 *N*-苄氧羰基亮氨酸-酪氨酸-谷氨酸胺酰-亮氨酸 (四肽 II) 和由 *N*-苄氧羰基- γ -甲酯-谷氨酸-天冬酰胺酰-酪氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-天冬酰胺甲酯 (五肽 III) 脫 *N*-保護基所得氨基自由的五肽 (IIIa) 經碳二亞胺法縮合而成。四肽 II 和五肽 III 都分別由二種不同方法合成的。多肽 I、II 和 III 皆經元素分析、紙層析、紙電泳、酶 (亮氨酸氨肽酶或胰凝乳蛋白酶) 水解分析證明係純粹, 均一的 *L*-型。

在含 50% 的二甲基亞磺的三 (羥甲基) 甲胺緩衝液中亮氨酸氨肽酶仍能將脫 *N*-保護基的四肽 II 與九肽 I 完全水解為相應的氨基酸。

* 本文所用中外文縮名及氨基酸的簡寫均同前文 (肽的研究 I), 又文中所有氨基酸均屬 *L*-型, 為簡便計名前“*L*-”一字從略。

** 通訊址: 中國科學院生物化學研究所。

肽 的 研 究

III. 牛胰島素 A 鏈中段帶保護基團的七肽

(*N*-苄氧羰基-*S*-苄基-*L*-半胱氨酸-*S*-苄基-*L*-半胱氨酸-*L*-丙氨酸-*L*-絲氨酸-*L*-纈氨酸-*S*-苄基-*L*-半胱氨酸-*L*-絲氨酸) 的合成

汪猷 陸熙炎 徐杰誠 張偉君 陳毓羣 蔡祖懌
韓廣甸 吳照華 徐錦文 余微明* 仲同生

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

本文報導了牛胰島素 A 鏈中段帶保護基團的 *L*-型七肽 (A_{8-12}) —— *N*-苄氧羰基-*S*-苄基半胱氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-丙氨酸-絲氨酸-纈氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-*O*-乙酰絲氨酸甲酯 (I) [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·Ala·Ser·Val·Cys(SBz)·Ser(OAC)OMe] 和 *N*-苄氧羰基-*S*-苄基半胱氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-丙氨酸-絲氨酸-纈氨酸-*S*-苄基半胱氨酸-絲氨酸 (II) [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·Ala·Ser·Val·Cys(SBz)·Ser·NHNH₂] 的合成。

我們用已知的二肽 III [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·OH] 與已知二肽 IV (Cbz·Ala·Ser·OMe) 作合成四肽 V [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·Ala·Ser·OMe] 的原料。IV 在冰醋酸溶液中進行催化氫化形成二肽 VI (H·Ala·Ser·OMe) 的醋酸鹽。III 與 VI 用碳二亞胺法縮合得四肽 V。IV 經溴化氫醋酸溶液處理脫去 *N*-保護基的同時發生了 *O*-乙酰化而得二肽 VI 的 *O*-乙酰衍生物 VII [H·Ala·Ser(OAC)·OMe]。III 與 VII 通過碳二亞胺法縮合得 IV 的 *O*-乙酰衍生物 VIII [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·Ala·Ser(OAC)OMe]。V 或 VIII 經脲解後都變為同樣的四肽酰脲 (IX) [Cbz·Cys(SBz)·Cys(SBz)·Ala·Ser·NHNH₂]。

我們曾企圖在乙醇溶液中氫化除去 IV 的 *N*-苄氧羰基但未得 VI 而得二肽內酰胺 (X) (3-甲基-6-羥甲基-2,5-二氧基吡嗪)。

從 *N*-苄氧羰基-*L*-纈氨酸和 *S*-苄基-*L*-半胱氨酸經羧酸-碳酸混合酸酐法接合得二肽 XI [Cbz·Val·Cys(SBz)·OH]。XI 與絲氨酸甲酯經碳二亞胺作用縮合成三肽 XII [Cbz·Val·Cys(SBz)·Ser·OMe]。

XII 經溴化氫醋酸處理得產物 XIII [H·Val·Cys(SBz)·Ser(OAC)·OMe]。XIII 不經純化直接與由四肽酰脲 IX 所得疊氮化合物縮合成七肽酯 I。七肽酯 I 與脲反應得七肽酰脲 II。

* 通訊址: 中國科學院生物化學研究所。

二肽 XI, 三肽 XII, 四肽 V, VIII 和 IX 及七肽 I 和 II 皆經元素分析證明係化學純。I, V, VIII, XI 和 XII 皆經脫去 *N*-保護基進行紙層析, 紙電泳檢定證明係純粹均一的肽。三肽 XII 和四肽 VIII 用溴化氫-二氧大圓脫去 *N*-保護基經氨肽酶水解及組成氨基酸分析證明係光學純 *L*-型。四肽 V 在脫去 *N*-苄氧羰基後, 先後接連經羧肽酶和氨肽酶水解及氨基酸分析證明亦係光學純的 *L*-型。所有四肽的酶水解都在含 50% 二甲基亞磺的緩衝液中進行。七肽 I 經酸全水解後, 測定其組成氨基酸的分子比為 $Cy_{2.7}A/a_{1.0}Val_{1.0}Ser_{2.0}$ 。由於 I 係由四肽酰肼 IX 經疊氮化物法與 XIII 縮合而成, 一般很少產生消旋, 因此七肽 I 及 II 當係光學純的 *L*-型。

胰島素 B 鏈中肽段的合成

V. 胰島素 B 鏈 C-端十肽衍生物的合成 及其降解的研究

龔嶽亭 葛麟俊 鈕經義

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

胰島素 B 鏈中 C-端十肽的衍生物, 即 $Cbz \cdot (\gamma-OCH_3)glu \cdot (N^G-NO_2)arg \cdot gly \cdot phe \cdot phe \cdot tyr \cdot thr \cdot pro \cdot (\epsilon-TOS)lys \cdot ala \cdot OCH_3 (B_{21-30})$ [熔點 187—189°, $[\alpha]_D^{20} = -30.5^\circ \pm 1.0^\circ (C_1, DMF)$, $[\alpha]_D^{20} = -31.0 \pm 1.0^\circ (C_1, \text{冰醋酸})$] 曾以 $Cbz \cdot (\gamma-OCH_3)glu \cdot (N^G-NO_2)arg \cdot OH (B_{21-22a})$ [熔點 120—122°, $[\alpha]_D^{20} = -6.5^\circ \pm 1.0^\circ (C_2, CH_3OH)$] 和 $H \cdot gly \cdot phe \cdot phe \cdot tyr \cdot thr \cdot pro \cdot (\epsilon-TOS)lys \cdot ala \cdot OCH_3 (B_{23-30a})$ 用碳二亞胺法於 DMF 中縮合而得。其中 B_{23-30a} 由 $Cbz \cdot gly \cdot phe \cdot phe \cdot tyr \cdot thr \cdot pro \cdot (\epsilon-TOS)lys \cdot ala \cdot OCH_3^{(1)}$ 經催化氫化而得, B_{21-22a} 係由 $Cbz \cdot (\gamma-OCH_3)glu \cdot ONP$ 和硝基精氨酸縮合而成。 B_{21-30} 經皂化所得的保護的十肽, $Chz \cdot glu \cdot (N^G-NO_2)arg \cdot gly \cdot phe \cdot phe \cdot tyr \cdot thr \cdot pro \cdot (\epsilon-TOS)lys \cdot ala \cdot OH (B_{21-30a})$, [熔點 186—190°, $[\alpha]_D^{32} = -31.0^\circ \pm 1.0^\circ (C_1, \text{冰醋酸})$] 能為腎羧肽酶所全部水解, 而為胰羧肽酶消化時只釋放出 C-端的丙氨酸, 這與 *N*-苄氧羰基八肽 (B_{23-30a})⁽¹⁾ 或胰島素 B 鏈經同樣處理所得的結果相符。 B_{21-30} 經較長時間的催化氫化可以脫除 N^G -的苄氧羰基和 N^G -的硝基, 但所釋放出的 α -氨基很容易和 γ -甲酯縮合, 形成四氫吡咯酮酰的九肽衍生物, 當溫度稍高 (40—45°) 環化得更多, 因此在電泳譜上僅能發現少量的十肽酯, $H \cdot (\gamma-OCH_3)glu \cdot arg \cdot gly \cdot phe \cdot phe \cdot tyr \cdot thr \cdot pro \cdot (\epsilon-TOS)lys \cdot ala \cdot OCH_3$, 而代之以大量的茚三酮陰性和坂口反應陽性的斑點。環化後的衍生物不能為氨肽酶所消化。另一方面, 在同樣條件下將 B_{21-30a} 進行催化氫化時, 由於 γ -羧基已游離, 並未有類似的環化產物而獲得 N^G -對甲苯磺酰化的自由十肽。 B_{21-30} 經溴化氫的冰醋酸溶液的短時間處理後茚三酮反應很明顯, 該物經氨肽酶消化也可釋放出谷氨酸 γ -甲酯、硝基精氨酸以及其他組成氨基酸或其衍生物。因而可以初步肯定十肽的 *N*-端谷氨基殘基當其 γ -

位置為甲酯時易形成四氫吡咯酮酰衍生物。模型試驗結果表明，在微酸性溶液中於30°的長時間的暴露，較短時間的加熱處理或在微鹼性溶液中進行層析時的放置，均能促進N-端谷氨酸- γ -甲酯的環化。當游離N-端為其他氨基酸殘基的谷氨酸- γ -甲酯的肽，在水溶液中雖經加熱其游離氨基並不減少。

任何胍基已游離的十肽衍生物，不論其中的 α -氨基已否環化，均能被胰蛋白酶水解為八肽和二肽的衍生物，這符合胰蛋白酶的專一性。這些衍生物和分別自二肽片段(B_{21-22a})及八肽片段(B₂₃₋₃₀, B_{23-30a})經催化氫化後所得的相當衍生物，不論從電泳或層析行為或環化的難易程度，均屬一致。由於H·(γ -OCH₃)glu·(N^c-NO₂)arg·OH可以被氨肽酶完全消化，八肽的光學純度也在前文^[1]證明，胰蛋白酶水解又是完全的，因此肯定了十肽的光學純度。

參 考 文 獻

- [1] 葛順俊, 龔嶽亭, 黃惟德, 祁國榮, 鈕經義: 胰島素B鏈中肽段的合成。I. 苄氨酸甘, 苯丙, 苯丙, 酪, 蘇, 脯, (對甲苯磺酸)類, 丙氨酸甲酯的合成。生物化學與生物物理學報, 1961年, 1卷, 85。

胰島素S-磺酸型B鏈的直綫聚合作用

魯子賢 彭加木 張友尙 曹天欽

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

一、蛋白質分子通過次級鍵的結合, 首尾相連, 又側向聚集, 形成纖維, 此即直綫聚合作用。其中研究得最早的是結晶胰島素形成纖維狀胰島素的過程。此後陸續發現有許多蛋白質都具有直綫聚合的能力。這一作用的重要性在於其聚集是定向的。蛋白質分子間或其與小分子之間是按一定的方式結合的, 而蛋白質的許多功能都與這種結合有關。因此研究直綫聚合作用不僅對了解生物纖維的形成有其意義, 對蛋白質分子間力的本質及蛋白質細微構型等都能提供有用的材料。

Waugh等證明胰島素的直綫聚合作用係在無鹽的稀酸中加熱所引起。其聚合過程分成二步, 先是核心的形成, 然後是核心生長成纖維。此纖維主要是胰島素分子間因非極性側鏈相互吸引形成疏水鍵而生成。關於胰島素B鏈, Leach與Scheraga雖曾指出氧化的磺酸型B鏈在pH3時有聚集體存在, 但沒有證明其有無直綫聚合作用。我們的這一工作說明S-磺酸型B鏈(以下簡稱B鏈)具有直綫聚合作用, 並證明其聚合過程係一自動催化過程。

二、濃度約1%, pH7—8之間的B鏈溶液置封管中, 35°C放置一天後於二光軸相互垂直的偏振片之間對光觀察, 可以看到有黑白的花紋, 此花紋逐漸呈具彩色。時間稍長, 溶液轉變成稠變膠。繼續放置, 即形成機械強度良好的凝膠。

經上述變化的B鏈溶液是非牛頓型的液體, 即其粘度因粘度計二端所加的壓力差而異。於流動雙折射儀中測定其消光角, 於很低的速度梯度時, 分子就開始定向排列, 當速

度梯度約 300 秒^{-1} 時，消光角即開始趨於常數。變化後 B 鏈的電子顯微圖中有大量細長而均勻的纖維，其直徑約 50 \AA 。

因此 B 鏈的上述變化係一直綫聚合作用，其結果生成長纖維。

三、B 鏈的聚合速度與溶液的 pH 值、離子強度 (μ)、B 鏈濃度、溫度以及某些機械因素有關。我們研究了前四種因素的影響。其結果說明，B 鏈的濃度增加，離子強度增加皆使聚合速度增加。聚合速度因溫度之升高而增加，但從 15°C 升到 25°C 時其變化較大，而 25°C 升到 35°C 則變化較小。溶液在 pH 6—9 之間時，pH 值降低，聚合速度增加。低於 pH 6 時沉澱而不聚合。高至 pH 9.0 時，當 $\mu=0.01$ ，不聚合； $\mu=0.11$ ，則粘度隨時間而增加，只是長時間後也不變成凝膠。

四、在能聚合的條件下粘度因時間而增加的曲綫皆呈 S-形——開始時變化較大，然後出現一粘度變化不大的誘導階段，之後粘度就一直增加，直至形成觸變膠與凝膠。從曲綫的 S-形看，這有可能係一自動催化過程。將少量聚合後的 B 鏈加入未經聚合的 B 鏈溶液中，後者的聚合過程即變快而使誘導階段消失不見。經電子顯微鏡觀察，於誘導階段可看到細短的纖維，然後這些短纖維連接起來結成長纖維。直到觸變膠形成，都是長纖維與短纖維並存的體系。形成凝膠以後，電子顯微圖中只有長纖維存在。

上述結果說明此聚合過程係一自動催化過程。可能反應的開始，先形成核心，出現一誘導階段；然後是這些核心相互連接形成長纖維。直至凝膠形成，核心才全部轉變成纖維。

五、將聚合 B 鏈溶液調至 pH 10 以上時，其粘度下降，但解聚並不徹底。將其調回至能聚合的 pH 範圍內時又復能聚合如前。8 M 脲中的解聚比高 pH 的解聚程度高，但也不能到單體的水平。

六、爲了比較，測定了 B 鏈單體的一些性質，結果如下：

| | $[\alpha]_D^{25}$ | λ_c | $[\eta]$ | f |
|----|-------------------|-------------------|----------|-----|
| 天然 | -71.6° | 2280 \AA | 0.058 | 5 |
| 變性 | -89.0° | 2140 \AA | 0.096 | 8 |

從旋光值估計，應有 20% 的螺旋度。從粘度值得軸比是 5。在 8 M 脲中，旋光負值變大， λ_c 變小，軸比變大。這些結果說明天然 B 鏈確係一有構型而較為對稱的分子。其直綫聚合的能力與構型的關係如何是值得繼續研究的。

七、除以上結論外，尚可提出二點：

1. 由於 B 鏈集中了胰島素的全部鹼性氨基酸，其聚合情況也與胰島素有某些類似之處，因此 B 鏈有可能是胰島素聚合作用的擔負者。

2. 從 pH 影響看，聚合過程與側鏈帶電情況有關。但從離子強度的影響看，一定的帶電狀態可能只是減低分子間的排斥力，而分子間的作用力可能係氫鍵或疏水鍵。濃脲中的解聚說明這二種鍵的存在都是可能的。將拆開硫-硫鍵的試劑加入 B 鏈溶液時，依舊能聚合，因此 B 鏈的聚合因硫-硫鍵交換形成網狀結構的可能性不大。

聚合機制在進一步研究中。

木瓜蛋白酶的研究

IV. 活性中心組氨酸殘基的羧甲基化

孫玉琨 鄒承魯

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

碘代乙酸, 碘代乙酰胺一向都被認為是典型的巰基試劑。Smith 等也曾根據碘代乙酰胺對木瓜蛋白酶的抑制研究了巰基與木瓜蛋白酶作用的關係。但是近年來的工作指出, 碘代乙酸, 溴代乙酸等與蛋白質側鏈基團的作用遠不是專一的。例如 Barnard 等研究高濃度溴代乙酸對核糖核酸酶的抑制結果指出, 溴代乙酸於不同 pH 條件下可以與核糖核酸酶中的組氨酸, 甲硫氨酸或賴氨酸殘基作用, 生成羧甲基衍生物。

我們在前文報導了組氨酸及色氨酸是木瓜蛋白酶的必需基團。進一步研究溴代乙酸對木瓜蛋白酶的抑制作用結果指出: 於 pH 5 及半胱氨酸過量 500 至 1000 倍的條件下, 微量的溴代乙酸或碘代乙酸對木瓜蛋白酶具有強烈的抑制作用。觀察溴代乙酸及碘代乙酸對木瓜蛋白酶抑制的當量關係, 按每克分子木瓜蛋白酶分子量 21,000 計算, 0.5 克分子溴代乙酸或碘代乙酸即可完全抑制。同時從測定碘離子的釋放量看來碘代乙酰胺對於木瓜蛋白酶的抑制當量與溴代乙酸相似。

溴代乙酸與木瓜蛋白酶作用後生成的羧甲基木瓜蛋白酶, 仍可結晶, 晶形與木瓜蛋白酶相同。說明溴代乙酸與木瓜蛋白酶的作用雖然使其活力完全喪失, 很可能並未引起酶分子的高級結構發生重大改變。為了說明溴代乙酸的作用點與木瓜蛋白酶活性中心的關係, 我們觀察了尿素對溴代乙酸抑制作用的影響, 結果木瓜蛋白酶在 pH 5, 6.2 M 尿素溶液中雖有半胱氨酸存在, 室溫放置 60 分鐘, 稀釋後測定活力不變。在同樣條件下有溴代乙酸存在時, 60 分鐘時間內活力降低 40%。但無尿素存在時, 在上述條件下僅 10 分鐘, 溴代乙酸對木瓜蛋白酶的抑制作用即達完全, 說明溴代乙酸的抑制與木瓜蛋白酶的空間構型有密切關係。當木瓜蛋白酶處在活化狀態時溴代乙酸才能作用。另外底物 L-白氨酸對木瓜蛋白酶受溴代乙酸的抑制具有顯著的保護作用, 這些都說明溴代乙酸的作用點很可能是木瓜蛋白酶的活性中心所在。但是溴代乙酸抑制前後巰基的測定結果表明木瓜蛋白酶的巰基含量不變。

為了進一步闡明溴代乙酸的作用點, 我們利用 0.2 N 醋酸溶液 1000 V 電泳後, 進行鹼相層析 (正丁醇:吡啶:60%乙醇:水=5:1:1:1) 分析組成氨基酸方法, 比較了木瓜蛋白酶和羧甲基木瓜蛋白酶的氨基酸圖譜。羧甲基木瓜蛋白酶氨基酸組成中在 S-羧甲基半胱氨酸位置無茚三酮顯色斑點, 這樣就排除了溴代乙酸與木瓜蛋白酶巰基作用的可能性。但羧甲基木瓜蛋白酶氨基酸圖譜中在門冬氨酸位置上部出現一新的茚三酮顯色點。同時我們也按 Gundlach 及 Stein 等的方法使溴代乙酸與核糖核酸酶作用, 以同樣方法比較了核糖核酸酶和羧甲基核糖核酸酶的氨基酸圖譜。結果羧甲基核糖核酸酶氨基酸圖譜中也在門冬氨酸位置上部出現一個新的茚三酮顯色點。已經知道核糖核酸酶不含游離巰

基,並且根據 Gundlach 等氨基酸分析結果,在他們的條件下溴代乙酸只作用於組氨酸殘基。因此這一新斑點很可能是羧甲基組氨酸。同時由於木瓜蛋白酶中無甲硫氨酸殘基,很可能溴代乙酸對木瓜蛋白酶的作用點也是組氨酸殘基。按 Gundlach 等方法製備的羧甲基組氨酸也在上述雙相電泳層析圖譜上出現相同位置的斑點。

根據本文實驗結果 0.5 當量溴代乙酸即可使木瓜蛋白酶完全抑制。溴代乙酸對木瓜蛋白酶具有這樣高效抑制作用在酶的抑制劑中也是罕見的。根據這一事實,尿素對溴代乙酸作用的影響,底物的保護以及氨基酸組成分析的結果,能被溴代乙酸作用的該組氨酸殘基很可能是木瓜蛋白酶活性中心的一部分。

琥珀酸脫氫酶異咯嗪輔基與酶肽的連接

戚德芳 王應暎 鄒承魯 方宇忠 俞家華

(中國科學院生物化學研究所,上海)

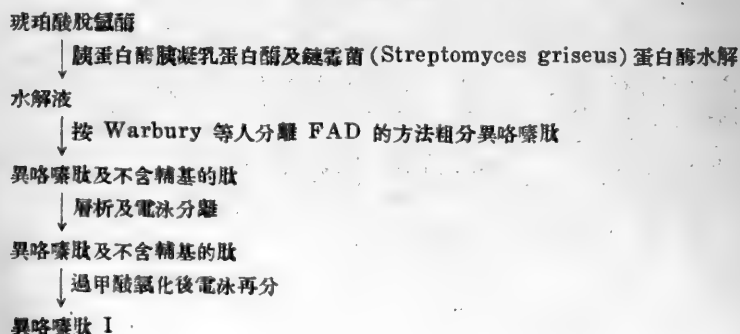
已經知道琥珀酸脫氫酶的酶肽部分與異咯嗪輔基的結合非常緊密。透析、變性或在酸性溶液中沉澱等均不能分離它們。蛋白水解酶的作用也不能分解輔基與酶肽連接的鍵而僅得到異咯嗪肽^[1]。因此闡明如此緊密結合的酶肽與輔基連接的方式將是十分重要而有興趣的問題。但由於材料的缺乏及工作本身的困難性,迄今為止,文獻中關於這方面的報導還很少。Singer^[2] 等人曾提出肽鏈可能是經酯鏈連於輔基中核糖醇的 OH 基上。Kearney^[3] 曾從牛心的琥珀酸脫氫酶分出含有 6,7 個氨基酸的異咯嗪肽,並測得絲氨酸位於 N 末端,因而認為肽鏈可能是以羧基連於異咯嗪上。早在 Kearney 的報告出現以前,本實驗室^[4] 根據異咯嗪肽在不同酸鹼度溶液中吸收光譜的變化以及異咯嗪在鹼性溶液中水解產物的鑒定,推測輔基與肽鏈的連接係通過異咯嗪環,其連接點可能是在環的 4 位(關於這方面工作的結果已在第五屆國際生化會議做過報告)。

本工作的目的是在進一步了解輔基與酶肽連接的方式和與輔基相連的肽段的氨基酸組成及排列順序。實驗所得的結果如下。

(1) 異咯嗪肽的分離與肽鏈中氨基酸組成的測定:

異咯嗪肽的製備與分離步驟總結於表 1 中。

表 1 異咯嗪肽的分離



應該指出，雖然經電泳層析等分離，但在未經氧化前所得到的異咯嗪肽中仍混有部份不含輔基的肽，只有氧化後再電泳分離才得到純的異咯嗪肽 I。異咯嗪肽 I 以酸全水解經雙向紙電泳層析分離氨基酸後定量測定，結果列於表 2。

表 2 異咯嗪肽的氨基酸組成 (與異咯嗪的分子比)

| 異咯嗪肽 | 異咯嗪 | 絲氨酸 | 甘氨酸 | 谷氨酸 | 門冬氨酸 | 丙氨酸 | 磺基丙氨酸 | 蘇氨酸 |
|------------------------|-----|------|------|-----|------|-----|-------|-----|
| I | 1 | 0.8 | 2 | 2.5 | 1.7 | 0.6 | 0.8 | 0.5 |
| II ₁ | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.3 | — | — | — | — |
| II ₁ | 1 | 0.95 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | — | — | — |
| II ₁ (鹼水解後) | ** | 1 | 0.45 | 0.3 | 0.4 | — | — | — |
| II ₂ | *** | 1 | 1 | 1 | 0.7 | 0.3 | — | 0.4 |
| III ₁ * | 1 | 0.9 | 0.4 | — | — | — | — | — |
| III ₂ * | *** | 1 | 1 | 1 | — | 0.5 | — | — |

* 從羊心攝取的琥珀酸脫氫酶。

** 鹼水解後異咯嗪環破壞，不可能測定其量，此處僅為氨基酸之分子比。

*** 在波長 450 mμ 的光密度讀數低。此處僅為氨基酸之分子比。

從表 2 的結果可以看出雖經鏈霉菌蛋白酶水解後，所得的異咯嗪肽的肽鏈仍較長，此異咯嗪肽也不能被氨肽酶羧肽酶等進一步作用。

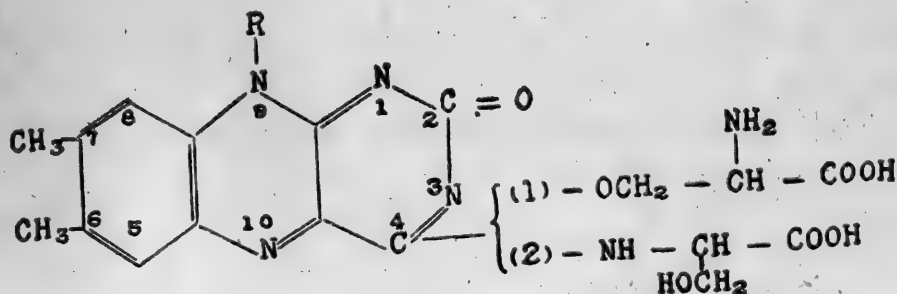
(2) 與異咯嗪輔基連接的氨基酸及鄰近輔基的肽段：

為了解決異咯嗪輔基與肽鏈連接方式的問題，我們將異咯嗪肽 I 在 12N HCl 37° 進行部份酸水解 48 小時，除去 HCl 後，再以磷酸酯酶水解，然後經紙層析及電泳分離。在最後一次電泳分離圖譜中得到異咯嗪肽 II₁ 及 II₂ (II₂ 為稻草黃色螢光，450 及 375 mμ 兩峯都消失，可能異咯嗪的核糖醇支鏈失去，生成 [6,7]-二甲基咯嗪肽) 異咯嗪肽 II₁ 更移向負極，肽鏈的氨基酸分析結果見表 2。這些結果指出通過酸部份水解可以得到僅帶有絲氨酸的異咯嗪輔基及較異咯嗪肽 I 的肽鏈更短的 II₂。根據這些結果與輔基連接的肽鏈順序很可能是：

異咯嗪輔基-絲氨酸-[甘氨酸-谷氨酸-門冬氨酸]-[蘇氨酸-丙氨酸]。

(3) 異咯嗪-絲氨酸的連接：

用 FDNB 方法未測得任何 N 末端氨基酸，因此可能絲氨酸以 N 端連接於異咯嗪環上 [如圖中 (2) 式所示]。但也可能輔基與絲氨酸按圖中 (1) 式以醚鍵相連，由於我們用以 FDNB 化的量較少或者在 FDNB 反應的條件下產生 N-O 移位而未能測得 N 端氨



基酸。肽鏈不可能是以絲氨酸的羧基與異咯嗪連接，因為這樣所生成的酯鍵將會被鹼所水解，而在鹼水解的實驗中我們得到仍帶有氨基酸或肽的異咯嗪輔基。關於連接鍵問題的工作目前正在進行。

(4) 異咯嗪肽的鹼水解：

異咯嗪肽 II₁ 在 pH 10.5 碳酸鈉緩衝液中 80—35° 進行鹼水解，水解反應中定量放出尿及仍連有肽鏈或氨基酸的異咯嗪的水解產物，此產物在 pH 2.7 及 pH 5.0 的緩衝液中電泳及在正丁醇-醋酸-水溶劑系統中層析均不與肽分離，經酸全水解後得到的氨基酸組成列於表 2 中，這些結果與本實驗室在去年國際生化會議上報告的數據符合，更確定肽鏈不可能連於異咯嗪環的 1, 2 或 3 位上，而可能在第 4 位。

(5) 羊心琥珀酸脫氫酶的研究：

從羊心提取的琥珀酸脫氫酶經同樣的步驟處理及分離提純異咯嗪肽，此異咯嗪肽經部分酸水解（條件與豬心琥珀酸脫氫酶同）得到類似的異咯嗪肽 III₁ 及 III₂，其氨基酸的定量組成數據列於表 2 中，根據表 2 的結果異咯嗪肽的氨基酸排列次序可能是：

異咯嗪-絲氨酸-[甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸]

從這些結果可以初步看出從豬心及羊心提取的琥珀酸脫氫酶中異咯嗪輔基均通過絲氨酸與酶肽連接，與輔基鄰近肽段的氨基酸組成及排列順序也大致相同。

參 考 文 獻

- [1] 汪靜英、鄒承魯、王應詠：生理學報 20, 84 (1956)；21, 174 (1957)；中國生理科學會第一屆會員代表大會論文摘要，化 15 (1956)。
- [2] E. B. Kearney, V. Massey and T. P. Singer: Fed. Proc. 15, 236 (1956).
- [3] E. B. Kearney: J. Biol. Chem. 235, 865 (1960).
- [4] 王應詠、汪靜英、鄒承魯、吳冠雲、陳善明：生化學報 2, 81 (1959)。

蓖麻種籽蛋白的滴定曲綫

徐永華 孫崇榮

(復旦大學生物系, 上海)

蛋白質的滴定曲綫呈現了分子中可解離基團所結合的質子數與溶液 pH 之間的關係。從滴定曲綫可推測蛋白質分子上存在可解離基團的性質和數目。

本工作取材於蓖麻種籽蛋白組份 B₁，係 0.37 飽和硫酸銨的鹽析產物。純化後的樣品紙電泳均一（巴比妥緩衝液，pH 8.5）。電位滴定使用帶有雷磁 221—222 玻璃電極-參比電極的 19 型精密酸度計進行；用分點法測定。濃度用乾燥法測定。根據在離子強度 $\mu = 0.049$ ，25°C 下的滴定曲綫及甲醛滴定結果，並考慮分子所帶電荷的靜電效應，推測有關基團數及相應滴定常數為：

| 基 團 | 每個分子上的數目 (合 $M=85,000$) | pK ₀ |
|------|-----------------------------|-----------------|
| 羧基 | 66 | 4.4 |
| 鹼基總數 | 70 | — |
| 咪唑基 | 17 | 7.0 |
| ε-氨基 | 24 | 9.4 |
| α-氨基 | (1) | 8.0 |
| 巰基 | 27 | — |

並推測在強酸性溶液中有 C_1^- 離子結合；pH 2 時結合數為 31，pH 3 時結合數為 15。

應用澱粉凝膠電泳法測定 我國（上海）人的 Hp 型

夏其昌 邱萬榮 方深高

（復旦大學生物系，上海）

1955 年 Smithies 採用澱粉凝膠為支持介質的區帶電泳，分離血清蛋白。此後，相繼出現澱粉凝膠的雙相、豎式和製備電泳。這種電泳法具有比目前所有的其他電泳法更高的分辨力，並且已被廣泛地應用到蛋白質化學、酶學、免疫化學和遺傳學等方面的研究。其中以血清蛋白質為材料的工作最多，在用於研究正常人血清時，發現屬於 α_2^- 球蛋白的結合珠蛋白 Haptoglobin (Hp) 顯著地有個體差異存在，可以有效地區分為三種類型，被命名為 Hp_{1-1} 型， Hp_{2-1} 型， Hp_{2-2} 型。尚有被命名為 Hp_{2-1} 變形型和找不到結合珠蛋白的 Hp_{0-0} 型，不過後二種類型很少見到。根據家系研究 Smithies 和 Walker 指出這些差異是在二個不完全顯性的等位基因 Hp^1 和 Hp^2 控制之下，遵守孟德爾獨立分離定律遺傳。表現型 Hp_{1-1} ， Hp_{2-1} ， Hp_{2-2} 的基因型各自為 Hp^1/Hp^1 ， Hp^2/Hp^1 ， Hp^2/Hp^2 。Parker 和 Bearn 曾綜合這方面材料，提出 Hp^1 基因頻度與地理分佈有關。許多學者認為 Hp 型的研究有着人類學上的意義。

由於這些意義以及這個方法對蛋白質的高度分辨力，所引起的興趣，我們選擇人血清為材料，進行了澱粉凝膠電泳，測定了 104 名我國（上海）人和一個家系的 Hp 型。

血清凝膠電泳參照 Smithies 方法進行。過程中，我們試用了國產馬鈴薯澱粉，同樣可以製得合適於做凝膠用的部分水解澱粉；改進了在電泳後，使凝膠透明的方法，以脲素加在洗脫凝膠底色用的溶液裏，簡化了以熱醋酸、苯醇或甘油處理的步驟；並且以常用的紙電泳槽代替凝膠專用的電泳槽，使用比較方便，在需要降低槽溫時，手續也較容易。

進行人的 Hp 型測定，也參照 Smithies 的方法，以硼酸為凝膠的緩衝液，電泳後，得到三種圖譜。在若干個血清樣品測定中，發覺在 Hp_{2-1} 與 Hp_{2-2} 型之間的一些結合珠蛋白，由於在遷移率上差別不顯著，工作條件稍有變化，便容易判斷出錯。另外 Hp_{0-0} 與

Hp₁₋₁ 型之間，應用此法，也不能區分。我們曾企圖改變凝膠的緩衝系統，使發生影響，經採用 Tris-C₆H₈O₇ (檸檬酸) 和 EDTA-Tris-H₃BO₃ 等緩衝液，沒有改善 Hp 型的鑒別力。在正式測定 Hp 型時，採用的是加以血紅蛋白(Hb)的血清作為樣品以聯苯胺染色，聯苯胺只對具有催化氧化作用的結合珠蛋白顯色，得到與純的結合珠蛋白相似的電泳圖譜，可以清楚無誤地區分出 Hp 的各種型別。現在看來，以單純血清的樣品，對 Hp 型測定不適合，但是用作其他目的，如病理血清等的研究工作，仍然有效。而且改變緩衝液，能得到特點不同的血清圖譜。

我們對 104 名健康人中進行 Hp 型測定結果：Hp₁₋₁ 型 9 人 (佔 8.65%)，Hp₂₋₁ 型 43 人 (佔 41.35%)，Hp₂₋₂ 型 51 人 (佔 49.05%) 以及 Hp₀₋₀ 型 1 人 (佔 0.96%)，沒有 Hp₂₋₁ 變形型。從上述比例計算得 Hp¹ 基因頻度是 0.29 與國外四處報導關於華僑的 Hp¹ 基因頻度很接近，它們分別為 0.28, 0.34, 0.29, 0.28。家譜 Hp 型的測定在法醫學上，可以作為在一般血型鑒定後，進一步的補充，因 Hp 型與其他血型獨立無關。我們對一個家系的測定結果，親代和子代(二女一男)共五人都是 Hp₂₋₂ 型是與假定的遺傳規律符合。

原肌球蛋白晶體的電子顯微觀察

曹天欽 龔祖埏 鄒永水 張友尙 彭加木

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

形狀不對稱的蛋白質在聚合成纖維或聚集成“晶體”時，分子常按一定規律取向排列，形成橫紋結構。在電子顯微鏡下觀察到的血纖蛋白和原膠原等的橫紋間距和細節，對了解其分子的外形，基團的分佈和分子間的相互作用，有很大裨益；對闡明生物纖維的結構特徵與其形成機制，也是極重要的線索。

在肌肉結構蛋白中，也有類似的現象，觀察到的細微結構如下：

| 肌肉 | 蛋白質 | 樣品 | 橫紋間距 | 橫紋細節 |
|-------|----------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|
| 兔骨骼肌 | 輕解肌球蛋白 Light meromyosin | 晶體 | 420 A | 5條 70 A |
| 同上 | 原肌球蛋白 Tropomyosin | 晶體 | 400, 200 A | 1條 200 A, 100 A |
| 海蚌閉壳肌 | 副肌球蛋白 Paramyosin | 晶體或纖維 | 1400, 725 A | 5條 145 A |
| 同上 | 同上 | 第二類纖維 type II fibril | 725 A | 5條 145 A |

除上述各點重要性外，這些特徵應也有助於區別肌肉蛋白的類型及尋找它們之間的關係。

此中值得注意的是原肌球蛋白與副肌球蛋白二者間的關係，以抽提方法，穩定性，氨

基酸組成,極性側鏈占61—63%分子的高度不對稱性,極高的 α 螺旋百分比等各種特徵相比,兩者小有差異而基本相同。區別最大之處在於副肌球蛋白在稀鹽溶液中溶解度很低,硫酸銨鹽析時也在40%飽和度前析出。因此文獻中也有稱之為“不溶性原肌球蛋白”的。但這種區分也不是絕對的。我們幾年前曾報導過對蝦原肌球蛋白在15%飽和度即析出。目前已有不少實驗證據,說明閉壳肌中的副肌球蛋白是“緊張收縮”的底物,相對於肌動蛋白和肌球蛋白是骨骼肌中“強直收縮”的底物。因此對於原肌球蛋白和副肌球蛋白關係的進一步了解,也是闡明到目前為止尚未清楚的原肌球蛋白生理功能的一個重要綫索。為此,我們根據上述的細微結構特徵,進行了一些電子顯微鏡觀察。

我們選擇了幾種肌肉,自其中製備出各種結構蛋白,將其提純結晶,然後將晶體移於火棉膠-碳膜上製樣品,用磷鎢酸(0.1%, pH 5.4)染色,或用鉑,金真空噴鍍投影,於日立Hu-11型電子顯微鏡下觀察其橫紋結構,所獲結果如下:

| 肌肉名稱 | 蛋白質晶體 | 樣品製備 | 結構特徵 |
|-------|---------|-------|-----------------|
| 兔骨骼肌 | 輕醇解肌球蛋白 | 金投影 | 480 A |
| 豬膀胱 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 200, 400 A |
| 鴨肫 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 200, 400, 800 A |
| 鵝肫 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 195, 780 A |
| 河蟹 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 800 A |
| 河蚌腹足肌 | 原肌球蛋白 | 鉑投影 | 410 A |
| 同上 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 410 A |
| 同上 | 副肌球蛋白 | 鉑投影 | 710 A |
| 河蚌閉壳肌 | 原肌球蛋白 | 磷鎢酸染色 | 750 A |
| 同上 | 原肌球蛋白 | 鉑投影 | 750 A |
| 同上 | 副肌球蛋白 | 鉑投影 | 720 A |

從上述結果我們作出以下幾個初步推論:

(一) 在系統發育上相隔甚遠的不同種族,從較低等的軟體動物河蚌的腹足肌中,一直到豬膀胱所抽提出來的原肌球蛋白的晶體,基本上都具有典型的結構特徵 200 A 和 400 A。

(二) 值得注意的是河蚌閉壳肌原肌球蛋白竟具有 750 A 週期的結構特徵,也即具有與副肌球蛋白類似的橫紋間距,這一初步推論還需進一步加以證實。

(三) 在鴨肫及鵝肫的原肌球蛋白體系中第一次觀察到原肌球蛋白具有 800 A 的橫紋間距和特殊的細微結構。值得注意的是:如果橫紋間距是 800 A 的話,根據分子排列的可能這兩種原肌球蛋白的分子長度顯然不會小於 800 A。過去我們曾對鴨肫原肌球蛋白進行過一系列的物理化學研究,發現它的分子軸比,分子量都比其他的原肌球蛋白大,初步看來,這些結果還是比較一致的。

到目前為止副肌球蛋白僅在軟體動物肌肉內發現,對於不同種屬動物原肌球蛋白的廣泛比較研究,對於肌原纖維的細微結構與抽提蛋白質之間的關係的尋找等工作,正繼續進行中。

兔原肌球蛋白中的半胱氨酸

任梅軒 徐俊傑 龔祖墳 曹天欽

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

兔橫紋肌原肌球蛋白在無鹽離子的水溶液中分子以直鏈方式聚合。這種聚合作用主要依靠側鏈的巰基與自由羧基間的相互作用。除了這種機制以外,在以往的工作中還注意到巰基的完整與否對聚合作用有很大的影響。目前,原肌球蛋白的化學結構尚不清楚。為了尋找這種解離聚合的特點與其結構之間的聯系,首先從好殊基團——巰基開始,企圖確定巰基的數目和了解巰基附近的氨基酸排列次序與空間構型。

兔原肌球蛋白中的巰基含量在文獻中已有報導,我們也做過多次測定,但由於製劑不同或測定方法不同(NEMI 滴定、NEMI 光譜滴定、PCMB 滴定、PCMB 取代等),數據頗為懸殊(0—4個-SH/分子)。我們將兔原肌球蛋白反覆提純淨化6—10次後按 Hirs 的方法將蛋白氧化,使巰基氧化成磺酸基。再從酸水解物經陰離子交換柱測定半胱磺酸的含量。同時,從氧化原肌球蛋白的酸部分水解液中分離得到一些含有半胱磺酸的肽段,並測定了它們的氨基酸排列次序。通過這一工作對國產濾紙和樹脂的應用初步積累了一些經驗。

1. 氧化原肌球蛋白的性質:

將多次淨化並經純度鑒定了的樣品進行冷凍乾燥,然後溶於過甲酸中,在 -10°C 氧化2½小時,透析除盡甲酸,再冷凍乾燥保存。

OTM 經二硝基氟苯法(DNP 法)及異硫氰酸苯酯法(PTH 法)鑒定沒有末端產生。樣品在 5.7N HC 中 110°C 水解24小時,再用 Moore & Stein 方法測定其氨基酸組成,證明:甲硫氨酸全部氧化成甲硫氨酸磺,半胱氨酸則變成半胱磺酸,而酪氨酸及其他的氨基酸都沒有遭到破壞。利用 Boyer 的 PCMB 法在 8M 尿素溶液中測得巰基含量為零,表示樣品氧化完全。OTM 不能結晶亦不能聚合,它的粘度行為與解聚了的原肌球蛋白相似。

2. 巰基的數目:

將 OTM 在 5.7N HC , 110°C 水解24小時,在 0.9×16 厘米的國產強鹼 201×2 柱中分析得半胱磺酸的含量為1.83個/分子。未經氧化的樣品經 Boyer 的方法在 8M 尿素溶液中測得巰基的數目為1.82個/分子。對於原肌球蛋白目前測定巰基似以此二法較準。從測定的結果看來,兔原肌球蛋白中含有2個巰基。

3. 半胱磺酸肽的分離和鑒定:

OTM 經 12N HCl , 37°C 水解7天,水解液除盡鹽酸後,加入 2×50 厘米的國產強酸 1×2 , H^+ 型樹脂柱上分離得半胱磺酸肽的混合物。然後在國產新華3號濾紙上進行電泳層析或在 2×50 厘米的強鹼 201×2 , C_1^- 型樹脂柱上用pH 梯度法進行分離。將提純的肽段分別用濾紙層析法,在新華1號濾紙上以正丁醇-甲酸-水(15:3:2)展層,鑒定純度,再用 DNP 法測定氨基酸組成及N-端。初步結果證明有三段肽含有半胱磺酸。它

們的排列次序是： $CySO_3H \cdot Ala$ ； $CySO_4H \cdot Phe$ ； $Leu [Asp, CySO_4H]$ 。其中 $Leu [Asp, CySO_4H]$ 的量很少，可能是從包含前二者之一的肽段中水解下來的。進一步的化學結構測定尚在進行中。

註：PCMB 代表對氯汞苯甲酸；NEMI 代表 *N*-乙基正丁烯二酰亞胺； $CySO_3H$ 代表半胱磺酸；Ala 代表丙氨酸；Phe 代表苯丙氨酸；Leu 代表亮氨酸；Asp 代表門冬氨酸；DNP 法代表二硝基氟苯法；OTM 代表羧化原肌球蛋白。

海洋動物肌肉結構蛋白的研究

I. 軟骨魚係原肌球蛋白的一些特性

潘家秀 王桂元 曹蕙婷 曹天欽

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

原肌球蛋白的研究多利用兔、牛等哺乳動物作材料，Bailey、Hamoir、曹等曾對幾種水產動物如魚（鱈、鯉、鯖）以及烏賊、明蝦等進行了比較研究。無論是物理化學性質或化學結構具有一些基本特徵，但也發現它們之間的微觀差異，這些差異必然與各該蛋白的功能有關。其中最突出的例子是海蚌閉壳肌的“不溶性”原肌球蛋白（即副肌球蛋白）。近來有許多證據說明它是“緊張性收縮”的底物。在肌肉蛋白的比較研究中，無脊椎動物的比重越來越大。在脊椎動物中由於軟骨魚接近演化梯階的最下層，與無脊椎動物接壤，在分子水平上追蹤其演化的痕跡，尋求結構功能的特點，仍是有其意義的。我們選擇了供應較多的鱈、鯊為代表，進行了一些研究。在方行中除了常用的物化和化學技術外，尚應用了靈敏度高、專一性強的免疫化學方法。以下是一些初步觀察和結果。

鱈（無斑鱈鱧等）和鯊（雛唇鯊）的原肌球蛋白分別按 Bailey 硫酸銨鹽析和乙醇沉澱法抽提和淨化七次以上，並得到了結晶。其溶解度、收吸光譜、熱穩定性、分子的不對稱性、螺旋構型、聚合能力等均與兔原肌球蛋白相似，並且不含無機磷，證實核酸不存在。鱈與兔相同，不含色氨酸，而鯊每分子約含一個色氨酸。超離心分析和自由電泳上行（pH 8.0 及 6.5）均得對稱均一的峯形，但自由電泳下行可觀察到峯形漸趨不對稱。瓊脂電泳和免疫電泳（pH 8.6）用溴酚藍、氨基黑、Nigrosin 染色可以見到快速部位有相對濃度極低的染色部分，雖經多次乙醇或鹽析法淨化均不能除去之。DEAE 柱層析和瓊脂電泳分離得主帶，重複操作後，快速部分又復出現。此快速蛋白對乙醇、熱、酸的穩定性與原肌球蛋白極相似，僅帶電性質與空間構型有所不同。因此可能：

(1) 原肌球蛋白局部巰基在操作過程中被氧化或由於其他緣故影響了空間構型和電荷分佈。

(2) 帶有非蛋白基團的原肌球蛋白，在實驗過程中解離或絡合。蛋白製劑雖不含核酸、脂染色劑也不顯色，但品紅法染色，證明慢速部分含糖。

(3) 其他原因使分子構型的不對稱性減小，降低了瓊脂篩效應。我們觀察到瓊脂濃

度低時，原肌球蛋白遷移率高，可能瓊脂對極不對稱的分子有阻礙作用。

(4) 不穩定肽鍵局部斷裂。以上幾種可能性有待進一步研究。

Bailey 和曹注意到原肌球蛋白的極度穩定性。製劑常以 70% 硫酸銨糊或真空乾燥長期保存。我們利用免疫電泳和瓊脂雙擴散法證實鱈、鯊原肌球蛋白經乙醇和熱(有鹽存在、中性)處理後，圖形與未經處理者相同，但凍乾後免疫反應極弱，顯然構型有所破壞，此與凍乾樣品有時失去結晶能力的事實相呼應。

我們測定了鱈、鯊原肌球蛋白的 $[\alpha]_{5780}$ 和 b_0 ，並根據 b_0 計算了 α -螺旋度。與此同時也作了七次淨化兔原肌球蛋白的相應數值，以資比較。觀察到他們的螺旋比兔的尤高；接近 90%。但將兔原肌球蛋白的數據與文獻值比較，則界於 Cohen 的和張和曹最近所發表的數據之間。Cohen 的數據可能偏高，因為在氯乙醇中的原肌球蛋白螺旋度超過 100%，難以理解，而張和曹所用的樣品已保存四年以上，螺旋可能有所喪失。最近我們注意到與此同期保存的另外幾種原肌球蛋白，溶解度雖仍然很好，但均失去了結晶的能力。

根據以上結果，如何保存原肌球蛋白使之不失原有的構型，將是一個值得注意的問題。

將不同種類的鱈以及同一板鰓亞綱，分屬不同目的鱈和鯊進行免疫交叉反應，觀察到前者相互間有交叉反應，而鱈、鯊間不起作用。

蓖麻蠶核型多角體病毒的研究

I. 形態及其他性質的觀察

II. 包含體酸鹼溶化曲綫

匡達人 連秉鈞 王應魁 金心梅 劉蓮英

(中國科學院實驗生物研究所, 上海)

本病毒是棒狀，由 1—3 個病毒棒集合在一起，被一個發育膜所包。約 34 個左右的發育膜，又被包含體蛋白質圍成一個有規則的多角體。

多角體的形狀有三角形，四角形，五角形及稜形。大小為 1.2—2.9 μ 。所以其形狀及大小都較家蠶的多角體為不均勻。病毒棒的尺寸是 250—280 \times 30—40 m μ 。

病毒繁殖於血液，脂肪，生殖腺，肌肉等組織內的細胞核內。感染途徑是通過腸胃道(口服)及體液(注射)。潛伏期為 8—20 天。

家蠶(家蠶科)，柞蠶(野蠶科)及褐刺蛾(刺蛾科)的核型多角體病毒均能離染蓖麻蠶。不同科的昆蟲的病毒能互相感染，表明這幾種病毒中，其與免疫有關的蛋白質部分，其差異不足以引起寄主的種屬專一性。

以家蠶病毒感染蓖麻蠶時，所產生的多角體形狀為家蠶型(六角形)。所以病毒包含體的形成，也是由病毒中的核酸所控制，而不決定於寄主的遺傳系統。由於家蠶與蓖麻蠶

病毒的包含體形狀截然不同，光學顯微鏡下，就可以看得見，因此，在進行病毒與寄主關係的研究時，這是一個很好的材料。

病毒中的核酸是脫氧核糖核酸。

要提煉這一病毒，必先溶化包含體。用酸或鹼來溶化包含體的能力，並非全都隨濃度而增加，而有一定的最佳濃度。例如 Na_2CO_3 的最佳濃度是 0.05 M ， HCl 的是 0.25 M ，而 NaOH 的濃度，則只要在 0.01 M 以上，都是有效的。

金屬鹽類的離子，對溶化的影響是顯著的，而且離子強度也有一個最佳點。以 KCl 言，最佳強度為 0.05 M 。

各種藥品對包含體溶化速度不同。

在最佳濃度下，輔以適當的金屬離子，所能溶解的包含體量是有濃度的。最大負荷是每毫升能溶 5 mg 多角體。

這一實驗，對純化病毒前的除去包含體這一過程所應採用的化學藥品的種類，濃度，離子強度，處理的時間，溫度及多角體負荷量，給於了啓發。並且使我們更了解包含體蛋白質的性質，其中可能存在氫鍵，以致凍結了遊離的活性基團，使包含體的化學反應性很弱，性質穩定。

幾個烟草花葉病毒毒株的化學和 物理化學的比較研究

張友尙 *裴美雲 曹天欽 *周家熾

(中國科學院生物化學研究所，上海；*中國科學院微生物研究所，北京)

在植物病毒中，烟草花葉病毒 (TMV) 是研究得最多的一種。在化學方面，TMV 普通株的氨基酸排列順序已經完全闡明。在物化方面，它的四級結構及分子形狀也研究得很清楚。株系間的比較研究是病毒研究的一個重要方面。首先株系關係的確定在病毒的鑑定上是十分必要的。同時對株系間在分子結構和生物學特性上存在的差異進行分析還可以使我們對於病毒的構結與功能的關係獲得一些綫索。

在國內，已經從烟草、油菜、地黃及楊樹上分離出四種病毒 (依次簡稱為 TMV-1, YMV₁₅, DDV 及 PV)，經生物學及免疫學鑑定已證明為 TMV 的株系。本工作的目的是從化學及物化方面對這四種株系進行一般的比較研究，以進一步證明它們與 TMV 的株系關係，並尋求株系間存在的差異。

在化學方面所作的分析有：(1) 氨基酸的定性組成；(2) C 末端的鑑定；(3) 胰蛋白酶酶解圖譜；(4) 胰蛋白酶酶解碎片的 N 端。

在物化方面的分析有：(1) 流動雙折射；(2) 等電點；(3) 紫外吸收光譜；(4) 電子顯微鏡觀察。

這四種株系的共同點是 C 末端均為蘇氨酸。根據電子顯微鏡及流動雙折射的觀察，

它們的形狀均為典型的棒狀，紫外吸收光譜和典型的 TMV 也大體相同。

但是除去以上的一些共同點而外，也可以看出株系間的某些差異，其中特別值得注意的是 YMV₁₅。從物化方面來看，YMV₁₅ 的聚集現象特別顯著，在電子顯微鏡下觀察可以看出 YMV₁₅ 容易聚集成束。在放置後 YMV₁₅ 容易分層而形成紡錘體結構，在正交偏振片間下層出現彩色的花紋。YMV₁₅ 的等電點也很高。與 YMV₁₅ 相似，DDV 也較易聚集成束，等電點也較高。根據免疫學的研究，DDV 與 YMV₁₅ 也有較多的共同抗體。這可能是由於 YMV₁₅ 與 DDV 的表面基團或電荷有類似之處。在化學方面，YMV₁₅ 也頗多特殊之處，它的酶解圖譜及酶解碎片的 N 端與其他株系有顯著差異。在氨基酸組成上，YMV₁₅ 含有組氨酸及甲硫氨酸。在國外株系的比較研究中，HR 株是比較特殊的，它也含有上述二種氨基酸。在這一點上 YMV₁₅ 與 HR 株是相似的。

從上述的一些結果來看，YMV₁₅ 的蛋白外壳是比較特殊的；顯然 YMV₁₅ 的一些生物學特性正是這些特殊結構的具體表現。因此深入研究 YMV₁₅ 的結構將有助於闡明病毒的結構與病毒感染功能之間的關係。這些工作正在進行中。

在本工作中病毒的提純兼用化學及物理方法。初步提純利用硫酸銨鹽析，然後再用超離心進一步純化。

為了使烟草花葉病毒被酶水解，必須使病毒解聚。本文提供了用氯乙醇使病毒解聚的新方法。病毒水溶液加等量氯乙醇後流動雙折射消失，加丙酮後沉出的蛋白質在水中的溶解度很好，吸收高峯由 260 m μ 變為 275 m μ 。解聚的蛋白很易被酶水解。

細菌 A-3 對幾種烴類化合物的氧化性能

王大琛 汪 猷

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

石油等烴類物質能被細菌氧化是久已知道的，但對這類鏈烴的微生物氧化尚少系統的研究。我們從土壤中分離篩選出一些細菌，經過兩個月的石臘油培養基培養，得到幾株能以石臘油作為唯一碳源而生長良好的菌種，其中之一編號為 A-3 (尚未鑑定)，是革藍陽性桿菌，在石臘油瓊脂(以石臘油和硝酸銨作為碳源和氮源)斜面劃綫處長成奶油色、平滑、油潤、成片的菌落，經十餘日後變成略帶淺紅色。該菌在石臘油培養液(石臘油 2%、硝酸銨 0.2%、磷酸二氫鉀 0.05%、磷酸氫二鈉 0.1%，硫酸鎂 0.02% 及微量鐵、鋅鹽 pH 7) 中，28° 振盪培養，繁殖迅速，菌體呈親油性。

在 37° 瓦堡呼吸器中，以 $\frac{M}{30}$ 磷酸鹽為緩沖劑，土壤細菌 A-3 能迅速利用空氣氧化高級鏈烴及其含氧衍生物：

(一) 鏈烷烴 正十六烷、正十八烷，粉末狀石臘(始溶點 53° 含 C₂₅ 烷烴) 的氧耗率 Q_o (N) 分別為 1238, 1830, 935 (此處及以下數據均已減去內源呼吸)。正辛烷和正癸烷氧化不顯著。該菌對正十六烷和正十八烷的呼吸商 RQ 分別為 0.27—0.47 (共四次，變動

稍大) 和 0.45—0.49 (共三次)。如完全氧化為二氧化碳和水則計算的呼吸商應為 0.65。這似說明烷烴分子的大部分已被氧化為二氧化碳和水。

(二) 脂醇及脂酸 粉末狀的正十六醇和十八醇能迅速被該菌氧化,其氧耗率分別為 1333 和 1308。粉末狀正十六酸和十八酸不被氧化,但其鈉鹽溶液 ($10^{-3} M$) 則易氧化,其耗氧率分別為 1425 和 833。正十六烷和正十六醇或正十六酸的混合氧化以及正十六酸和正十六醇的混合氧化的氧耗率分別為 1520, 1632 和 1528。混合氧化比各底物的氧化略高,但遠不及兩種底物單獨氧化氧耗率之和。

(三) 芳烴、環烷及其他 該菌對苯和甲苯(皆用飽和水溶液)萘、蒽、菲、環辛烷、胆甾醇和胆酸鈉 ($10^{-3} M$) 沒有顯著的氧化,其氧耗率 (25—123) 凡與內源呼吸相仿。

(四) 脛類氧化的抑制 不同濃度的疊氮化鈉,氰化鈉和碘醋酸 (10^{-4} — $10^{-2} M$) 對菌 A-3 氧化正十六烷和正十六醇的能力有不同程度的抑制(20—84%)(附表)。三種抑制劑對這兩種底物的氧化抑制作用似無明顯的區別。

從以上混合氧化和抑制氧化的試驗結果看來,正十六烷及其相應的醇和酸在菌體內可能是通過相同的途徑氧化,而主要的氧化酶系似屬於含金屬的氧化酶。

附表 幾種抑制劑對土壤細菌 A-3 氧化正十六烷和正十六醇的影響

| 抑制劑 | 最終濃度 | 氧耗率抑制 % | |
|------|------------------------|---------|------|
| | | 十六烷 | 十六醇 |
| 疊氮化鈉 | $2.5 \times 10^{-3} M$ | 25.2 | 27.3 |
| | $5 \times 10^{-3} M$ | 36.2 | 64.8 |
| | $10^{-2} M$ | 69.4 | 84.1 |
| 氰化鈉 | $2 \times 10^{-4} M$ | 36.2 | 20.0 |
| | $5 \times 10^{-4} M$ | 69.8 | 48.4 |
| | $2 \times 10^{-3} M$ | 75.3 | 59.7 |
| 碘 酸 | $5 \times 10^{-3} M$ | 74.2 | 65.8 |
| | $10^{-2} M$ | 84.2 | 70.7 |

表中係同一批細菌的實驗數據。每個瓦堡呼吸瓶加 0.427 毫克氮的細菌量。

石臘油的細菌氧化產物三種 高級脂肪酸的初步研究

黃敬堅 王大琛 周樂 汪猷

(中國科學院有機化學研究所,上海)

土壤細菌 A-3 (見前文報導) 在以石臘油為唯一碳源的培養液內產生三種特殊的高級脂肪酸: 酸甲 ($C_{15}H_{30}O_2$), 酸乙 ($C_9H_{18}O_2$) 和酸丙 ($C_{12}H_{24}O_2$)。

分離 將細菌 A-3 接種在石臘油——硝酸銨培養液中, 28° 振盪 4—5 天。發酵液

漸呈乳濁狀，pH 下降至 6.2 左右。離心分去菌體後，發酵液經酸化放置。分出的菌體以石油醚洗滌。(石油醚洗液即用以提取已經靜置的酸化培養液)。混濁的石油醚提出液中含剩餘的原料石臘油，中性產物，石油醚可溶性有機酸，以及呈懸膠狀存在的石油醚不溶性有機酸等。不溶性酸可以通過離心分離，再經苯-70% 甲醇水溶液分溶純化。從水層獲得固態的酸甲 (I)。經離心後的澄清石油醚提出液再以氫氧化鈉溶液提取其中石油醚可溶性酸部分，鹼性提取液經酸化後可分離得液態的酸性物質。後者再用石油醚(60—90°)-70% 甲醇水溶液(含 10% NaCl)(體積比 5:3)作溶劑，應用逆流分溶法進行進一步分離。經 110 次轉移，用鹼滴定測得第 41 和 79 管前後各有一高峯。分別自第 24 管至 51 管和 65 管至 83 管收集得到液態的酸乙(II)和酸丙(III)。兩者可以通過真空分餾純化。

酸甲 (I) 石油醚不溶性的固態酸易溶於乙醇，其鈉鹽(IV)先後經 90% 乙醇和水結晶純化依次得無色鱗片狀和針狀有弱旋光性的結晶[熔點 177—178°， $[\alpha]_D^{15} - 0.7^\circ$ (C 1.06, 水, l 4.0 分米)。IV 的水溶液經酸化後分離得一有弱旋光性固態的游離酸甲(I)，熔點 103—104°， $[\alpha]_D^{24} + 2.1^\circ$ (溶解後立即測定，C 3.2, 乙醇, l 4.0 分米)]，根據分析係無支鏈的飽和十五碳酸。(分析 $C_{15}H_{30}O_5$ ，計算值%：C 62.04；H 10.41；C- CH_3 5.18；中和當量 290。實測值%：C 62.18；H 10.53；C- CH_3 5.19；中和當量，292。)從 IV 製得對溴苯甲酰甲酯(V，熔點 150.5—151.5°)；從 I 製得其甲酯(IV，熔點 98—99°)，從 VI 得酰胺(VII，熔點 146.5—147.5°)，*N*-苄基酰胺(VIII，熔點 140—141°)和酰肼(IX，熔點 165—166°)都經分析證明。

I 具有羥基和羧基紅外吸收峯 [γ_{max} : 3450 (強), 3290 (強), 1695 (強), 1658 (中) 厘米⁻¹]。VI 與 3,5-二硝基苯甲酰氯作用生成三-(3,5-二硝基)苯甲酸酯[X，熔點 150—151°， $[\alpha]_D^{15} - 3.6$ (C 2.1, 二氧六圓)，分析 $C_{37}H_{38}O_{20}N_6$ ，計算值%：C 50.12；H 4.32；N 9.48。實測值%：C 49.88；H 4.42；N 9.69]。因此 I 應係一種三羥酸 $C_{14}H_{28}(OH)_3COOH$ 。

I 在乙醇溶液中，部分自動環化而成內酯(XI)，I 與 XI 在溶液中呈一平衡狀態，因而有變旋現象， $[\alpha]_D^{24} + 2.1^\circ$ (開始) $\rightarrow +18^\circ$ (220 小時)；I 在乙醇—濃鹽酸(95:5，體積)中內酯化很快，迅速達到這一平衡。其 $[\alpha]_D^{16} + 10.8^\circ$ (C 1.5) 從開始到後來不變。我們從 I 與乾苯的迴流產物中確實分離得它的內酯 XI [熔點 63—64°， $[\alpha]_D^{15} + 59^\circ$ (C 1.35, 乙醇)，分析 $C_{15}H_{28}O_4$ ，計算值%：C 66.14；H 10.36。實測值%：C 65.98；H 10.49]。XI 具有羥基及內酯 C=O 的紅外吸收峯： γ_{max} 3510 (強), 3350 (強), 1705 (強)。XI 的內酯環存在由它與 3,5-二硝基苯甲酰氯作用僅產生二-(3,5-二硝基)苯甲酯(XII，熔點 173—174°，分析 $C_{20}H_{32}O_{14}H_4$ ，計算值%：C 53.38；H 4.94；N 8.59。實測值%：C 53.21；H 4.77；N 8.26)，以及它與肼反應生成 XI 而進一步證實。XI 在乙醇—濃鹽酸中的旋光性 ($[\alpha]_D^{15} + 10.8$ [C 3.0]) 與 I 相同。所以 I 系一直鏈的三羥基十五酸，其中一個羥基在 C_4 或 C_5 地位，能形成 γ - 或 δ - 內酯。從 XI 的紅外吸收峯推測可能為 δ - 內酯。

酸乙 (II) 及酸丙 (III) II (沸點 108°/1 毫米) 和 III (沸點 134°/1 毫米) 均係飽和酸而有旋光性 [II: $[\alpha]_D^{23} + 23.5^\circ$ (C 5.0, 乙醇)；III: $[\alpha]_D^{22} + 25.7^\circ$ (C 1.9, 乙醇)]。由元素分析，中和當量測定及衍生物的製備和分析證明 II 為具有一至二支鏈的九烷酸(分析 $C_9H_{18}O_2$ 計算值%：C 68.31；H 11.47；2C- CH_3 19.0；3C- CH_3 28.5；中和當量 158。實測值%：C 68.35；H 11.23；C- CH_3 21.46；中和當量 160)。II 的甲酯：沸點 189.5—

190°, $[\alpha]_D^{25} + 29.5^\circ$ (C 2.0, 乙醇); 和它的 S-苄基硫脲鹽 [熔點 124—125°, $[\alpha]_D^{25} + 7.0$ (C 2.1, 乙醇)]. 又 III 系具有二個或二個以上支鏈的十二烷酸 (分析 $C_{12}H_{24}O_2$, 計算值%: C 71.95; H 12.08; 3 C-CH₃ 22.53; 中和當量 200。實測值%: C 71.27; H 11.78; C-CH₃ 22.73; 中和當量 202)。III 的酰胺 [熔點 67.5—68.0°, $[\alpha]_D^{25} + 35.3^\circ$ (C 1.9, 乙醇) 和 III 的 S-苄基硫脲鹽 (熔點 117.5—118.0°, $[\alpha]_D^{25} + 5.2$ (C 1.1, 乙醇)]. 皆經分析證明。

I, II 和 III 的結構尚在繼續研究中。

氫化可的松的微生物氧化

張麗青

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

(一) 氫化可的松的細菌氧化產物:

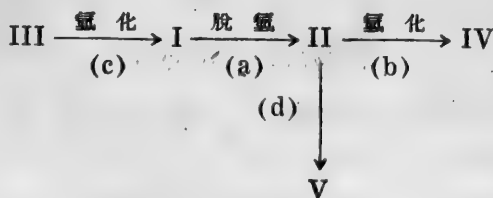
從土壤中分離得的細菌 *C. B.*₄ (*Corynebacterium* sp. *B.*₄) 在 N_{14} 培養液 (0.1 克 NH_4NO_3 , 0.1 克 K_2HPO_4 , 0.05 克 $MgSO_4$, 0.05 克 KCl , 極微量 $FeSO_4$, 2 克麥芽糖, 100 毫升水, 滅菌前 pH 7.0) 內 28° 振盪培養 15 小時後, 加氫化可的松 (I) (10 毫克氫化可的松溶解於 1 毫升 95% 乙醇), 繼續振盪 3 小時。發酵液按一般方法提取及經反相紙層析二次顯層, 紫外光檢視層析譜發現有四斑點: (1) 氫化可的松 (R_f 0.47), (2) 1-去氫化可的松 (II) (R_f 0.28), (3) 未知物甲 (III) (R_f 0.17), (4) 未知物乙 (IV) (R_f 0.1)。根據兩未知物的極性較 I 及 II 為大, 又與 TPTZ 和藍色四唑 (blue tetrazolium) 均不顯色。很可能均為 $C_{(20)}$ -酮的還原產物。層析分離的產物皆經按 242 $m\mu$ 的光吸收強度初步定量。

在少量空氣存在下發酵, II 的生成很少, 大部分 I 已變化 III, 但無 IV 的產生。反之如僅以 II 作底物則只有 IV 的產生。

從上述結果推論很可能 III 為 11 β , 17 α , 20 ξ , 21-四羥基- Δ^4 -孕甾烯酮-(3), 而 IV 似為 11 β , 17 α , 20 ξ , 21-四羥基 $\Delta^{1,4}$ -孕甾二烯酮-(3)。

細菌氧化的時間如延長至 5 小時, 經紙層析檢定, I 的量減少不多, II 更多消失, 另外又出現不移動的一個斑點 [未知物丙 (V)], 在檢視燈下不吸收紫外光, 而能與 TPTZ 顯色, II 的分子中 $C_{(20)}$ -酮基似仍存在, 其結構尚待證明。如直接以 II 經 2 小時細菌氧化, 亦產生 V。

因此 I 的細菌氧化歷程如下:



(二) I 的細菌氧化的抑制:

在 I (10 毫克) 的細菌氧化過程中加 (1) 對氨基酚 (VI), (2) 對氯苯酚 (VII), (3) 對羥基聯苯 (VIII), (4) 8-羥基喹啉 (IX) 或 (5) 鄰硝基苯酚 (X), 5—6 小時後與對照比較得知 VI 或 VII (各 $0.5 \times 10^{-3} M$) 對氧化產物中所含 I (1.1 和 1.5 毫克) 及 II (1.5 和 2.2 毫克) 的量無影響, VIII、IX (以上各 $0.5 \times 10^{-3} M$) 或 X ($0.43 \times 10^{-3} M$) 似抑制了歷程中 (d) 的一步 (I 分別為 1.3, 0.9 和 0.8 毫克, II 分別為 4.1, 5.2 和 4.4 毫克)。(對照: I 0.5 毫克; II 1.6 毫克)。另一實驗比較 IX 對 3 小時和 5 小時 I 的細菌氧化抑制的結果顯示在 3 小時終了, 對照的 I 和 II 分別為 0.8、4.6 毫克而加 IX 的 I 和 II 分別為 2.3、4.3 毫克。5 小時終了時對照的 I 和 II 分別為 0.6 和 2 毫克, 而加 IX 的 I 和 II 為 0.8 和 5.8 毫克。IX 似除抑制了 (d) 的一步外。還抑制了 I 的破壞。

初步試驗細菌如不先與 I 接觸雖與 II 一起培養 5 小時亦不見 II 的損失, 因此菌體內破壞 II 的酶開始時似不存在或不活潑。

如細菌 C. B₄ 先與氧化可的松培養 4 小時, 然後試驗各種濃度的 IX ($0.5 \times 10^{-3} M$) 和 X (43×10^{-3} 和 $1 \times 10^{-3} M$) 分別抑制該菌對 II (4 毫克) 的作用 (作用 2 小時), 結果顯示對照與加 $0.43 \times 10^{-3} M$ X 的試驗產物分別有 38 和 32% 的 II 已破壞, 並有 V 的產生; 加 $10^{-3} M$ X 和 IX 的試驗產物中 II 很少破壞 (分別為 0 和 5%), 並不見有 V 的生成。IX 與 X 似都有抑制作用, 且 IX 比 X 為強。

另一實驗經 I 預培養的菌與 I (6 毫克) 及 X ($10^{-3} M$) 共同振盪 2 小時, 產物中所有 I (1.1 毫克), II (4.9 毫克), 與對照的 (I, 0.8 毫克; II, 4.5 毫克) 無顯著差異。X 對 II 的破壞有抑制作用, 但對 I 的脫氫似無抑制作用。

β-二萘二醌對胺類的催化 氧化的初步報告

汪猷 黃敬堅 楊淵珠 陳增壽 王大琛

(中國科學院有機化學研究所, 上海)

各種醌對 α-氨基酸的催化作用是人所熟知的, 但對其他類型氨基化合物的催化反應尚少研究。本文報導了我們關於以 1,1'-二萘二醌-(3,3',4,4') 作催化劑對 α-, β- 和 γ-氨基酸氧化的催化活力的比較, 對胺及磷羥基胺類的作用, 以及對正丁胺的催化氧化所生產物的研究結果。

實驗材料及方法

按照 Langenbeck 的方法用 Warburg 法測定氧耗量比較催化劑的活力。溫度 37°, 用 10% 醋酸-吡啶作介質。催化劑用量約 1—20 微克分子; 底物用量約 20—300 微克分子; 反應液總體積為 2 毫升。氧耗量的計算已減去催化劑的自動氧化氧耗量, 一般底

物自動氧耗量很低可不計算。

結 果

(一) α -、 β - 和 γ -氨基酸的氧化 我們發現在二萘二醌的存在下,不但 α -氨基酸能被空氣氧化, β - 和 γ -氨基酸也能被氧化。在三小時內 90 微克分子 α -丙氨酸, β -丙氨酸, γ -丁氨酸和甘氨酸的氧耗量分別為 468、504、548 和 848 微升。除甘氨酸外,其他氨基酸的氧化速率似隨其分子中氨基與羧基間之碳鏈之增長而增加。另一實驗亦證明 δ -戊氨酸(102 微克分子)也能被二萘二醌催化氧化(687 微升 O_2 /3 小時)。因此在這一催化氧化反應中分子中羧基的存在似非必需。

(二) 胺類的氧化 在二萘二醌的存在下,各 90 微克分子的乙胺、丙胺、丁胺、苄胺、羥基乙胺和磷羥基異丙胺分別進行催化氧化,三小時內的耗氧量分別為 326、436、476、626、734 和 784。這一結果顯示二萘二醌對沒有羧基的胺類化合物亦具有強烈的催化氧化作用,對磷羥基胺的作用似更強。對照實驗證明乙醛、丁醛等自動氧化的氧耗量及在催化劑的存在下的氧耗量依次為 356、82、430、192。而磷羥基醛如甘油醛則分別為 334 和 852。因此磷羥基胺的催化氧化較快,可能由於初步氧化的產物磷羥基醛或羥基酮發生了進一步的快速氧化所致。

(三) 每分子氨基化合物的氧耗量 20 微克分子的 α -丙氨酸、正纈氨酸和正丁胺分別與等分子比的催化劑進行 24 小時的催化氧化,按每分子底物計,分別在最初 9、6.5、3.5 小時內很快地消耗了約半分子氧,此後氧化速度減慢,到 16 小時以後已不顯著。在 23 小時內 α -丙氨酸、正丁胺和正纈氨酸分別消耗 0.7、0.9 和 1.1 分子氧。這似與一般氨基酸經茚三酮或醌的氧化每分子祇消耗半分子氧的結果不符,可能由於以二萘二醌作催化劑時胺類的催化氧化包括二步反應:(1) 胺的氧化成醛;(2) 產物醛的進一步氧化。前者似較速,後者較慢。

(四) 二醌二萘對氨基化合物的催化活力 300 微克分子的乙胺、 α -丙氨酸、 γ -丁氨酸、正丁胺和正纈氨酸各與 1 微克分子二萘二醌進行催化氧化反應 12 小時,氧耗量分別為 5.2、8.9、18.7、12.5 和 25.4 微克分子氧。如每分子氧的消耗約相當於一分子氨基化合物的氧化,則每分子催化劑約能催化 5.2 分子乙胺,8.9 分子 α -丙氨酸、18.7 分子 γ -丁氨酸、12.5 分子正丁胺和 25.4 分子正纈氨酸。在反應初期 α -氨基酸的氧消耗雖不強,但很持久,到 12 小時後催化劑的活力尚未消失。反之 γ -氨基酸和胺類在反應初期氧化較快,但不持久,5—6 小時以後催化劑的活力已不顯著,氧的消耗顯著減低。

(五) 正丁胺催化氧化產物的鑑定 前人曾證明以醌類物質作催化劑 α -氨基酸的氧化產物為同系低一級的醛,靛紅能氧化苯甲胺為苯甲醛,但對於非 α -氨基酸和一般的脂肪族胺的催化氧化尚少研究。我們進行了正丁胺催化氧化產物的分離,並證明了丁胺氧化成丁醛。400 毫克二萘二醌、400 毫克正丁胺與 28 毫升吡啶和 12 毫升 10% 醋酸經 6 小時 120—130° 加熱,同時通入空氣。從逸出的氣體中利用 2,4 二硝基苯肼捕獲得 54% 理論量的丁醛 2,4 二硝基苯肼。以 2N 硫酸代替醋酸則該肼的得率可提高至 67%。

核酸類化合物對 C^{14} -甘氨酸參入到大腸桿菌原生質體製劑中的影響

董霖 孟威廉

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

Spiegelman 及 Nisman 等人的工作均已表明, 細菌原生質體膜的氨基酸參入活性較其他無細胞製劑的系統為高。本文採用 Lissapol 處理大腸桿菌原生質體的系統, 試圖探討 C^{14} -甘氨酸的參入現象。

按照 Lederberg 的方法製備大腸桿菌 K_{12} 株的原生質體, 用溶液 1* 洗沉澱二次, 經冷凍離心, 將沉澱懸浮於溶液 1 中。加入等體積的 Lissapol 溶液 (5% V/V 溶液 2**) 立即擾動, 再經過勻漿 1 分鐘, 然後放置 5—10 分鐘, 使其在 $680 m\mu$ 光密度的下降約為原來之 50%。離心 $30,000 \times g$, 收集沉澱部分, 再用溶液 2 以同樣離心速度洗二次, 最後懸浮於溶液 2 中, 使此懸浮液的蛋白含量約為 3—5 毫克/毫升。

原生質體製劑, 加 ATP, GTP, Mg^{2+} , 17 種混合氨基酸, C^{14} -甘氨酸及 TRIS 緩衝液 pH 7.4, 在 $35^{\circ}C$ 保溫 $1\frac{1}{2}$ 小時後, 加 10% 三氯醋酸停止反應, 再經過三氯醋酸洗沉澱數次, 熱三氯醋酸處理 ($100^{\circ}C$, 15 分鐘) 及有機溶劑處理, 待沉澱乾後, 加 $3N NH_4OH$ 使其溶解, 用溶體鋪樣法, 鐘罩型計數管測定放射性強度, 以每毫克蛋白, 每分鐘的脈衝數計算參入活性。

在完整的反應系統中減去 GTP 及混合氨基酸後, 活力稍有下降。S-RNA 對甘氨酸的參入有時有提高作用, 但不顯著。大分子 RNA 的效應則更不明顯。然而不論是 S-RNA 或大分子 RNA, 經 $0.3N KOH$ 水解 46 小時後, 刺激作用都顯著增高, 水解液經過透析, 刺激作用又隨之下降。由於 KOH 水解 RNA 主要得到 2', 3'-核苷酸, 因此直接觀察核苷酸對甘氨酸參入的影響。結果四種單核苷酸 (腺, 鳥, 胞, 尿) 對參入反應都有刺激作用, 其中以尿嘧啶核苷酸為最高, 有少數情況腺嘌呤核苷酸較其他三者為高。四種核苷酸同時加入, 其刺激作用並不等於個別核苷酸作用之和。尿嘧啶核苷酸的刺激作用, 在加入後 10 分鐘內已很顯著。

核苷對甘氨酸的參入亦有刺激作用, 其效應較之核苷酸為差。核糖無影響, 碱基稍有抑制。

除核酸類化合物外, 同時也觀察到甘油及 6 碳單糖對甘氨酸參入亦有刺激作用, 與 Gale 及 Folkes 工作所提及的“參入因子”系統相類似, 5 碳糖及雙糖則基本上無甚影響。

為證明 C^{14} -甘氨酸參入到蛋白質肽鏈中, 首先觀察到甘氨酸參入受氯霉素的抑制, 同時分別用羧肽酶及 2,4-二硝基氟苯處理並分離出蛋白質的 C, N 末端氨基酸, 分別測定同位素氨基酸的分配部位, 進一步證明參入到末端的甘氨酸僅佔少部分, 絕大部分係參入

* (溶液 1: 琥珀酸 $0.5M$, TRIS $0.05M$, $MgSO_4$ $0.008M$ pH 7.4)。

** (溶液 2: 琥珀酸 $0.25M$, TRIS $0.05M$, $MgSO_4$ $0.02M$ pH 7.4)。

到蛋白質的肽鏈中。

由於實驗中觀察到 Lissapol 處理前後的原生質體製劑對參入反應無顯著的區別，僅完整的原生質體活性較高，故最後有少數實驗係採用完整的原生質其製劑。

綠豆中兩種胰蛋白酶抑制劑的 提取、結晶與活力測定

屈賢銘 戚正武

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

在各種豆類植物的種子中都含有很豐富的胰蛋白酶抑制劑，而一般又包括對熱不穩定(在 2.5% TCA 80°C 下加熱 5 分鐘)的大分子組份(分子量約 20,000 左右)和對熱穩定的小分子組份(分子量少於 10,000)。前者如大豆(Kunifz, 1945)，洋扁豆(Tauber 1949)中得到的結晶制劑，後者文獻中尚無詳細的報導。我們從綠豆中提取了兩種小分子量，高活力的胰蛋白酶抑制劑，並獲得了結晶。

比較了大豆、蠶豆、綠豆、洋扁豆、赤豆中小分子胰蛋白酶抑制劑的含量和比活力。其中以綠豆中的含量和比活力最高，蠶豆次之，因而以綠豆為原料，進一步加以提純。

將綠豆粉以四倍體積 0.25 N H_2SO_4 在室溫下抽提，離心去殘渣，清液加 TCA 至 2.5% 濃度。離心去沉澱，清液調 pH 至 5，加固體 $(NH_4)_2SO_4$ 至 0.75 飽和度。過濾後之沉澱對 1.5% NaCl pH 7.5 0.05 M 磷酸緩衝液透析，透析後之清液加等體積 5% TCA 在 75°C 下加熱 5 分鐘，立即冷卻。去沉澱後之清液再以 0.75 飽和 $(NH_4)_2SO_4$ 沉澱。濾餅溶於三倍水對 0.005 M pH 7.8 磷酸緩衝液透析，然後用 DEAE 纖維粉吸附分別用 0.015 M; 0.12 M 及 0.12 M 中含有 1 M NaCl 的 pH 7.8 磷酸緩衝液分級洗脫。在後二洗脫液中得到具有胰蛋白酶抑制劑活力的峯形。將具有活力的洗脫液合併濃縮後再用 DEAE 纖維粉吸附，並用梯度層析法洗脫，洗脫液分別為 0.3 M NaCl + 0.01 M pH 7.8 磷酸緩衝液 1 M NaCl + 0.075 M pH 7.8 磷酸緩衝液。二者都得到層析純的高活力制劑。由低鹽濃度洗脫下來的組份 A 經濃縮後(1% 濃度)對 0.01 M pH 5.4 醋酸緩衝液透析，在 5°C 下放置數日後即得到紡錘狀結晶，產量每公斤綠豆約 100 毫克。由高鹽濃度洗脫下來的組份 B 經濃縮後，對含 0.35 飽和 $(NH_4)_2SO_4$ pH 5.5 0.1 M 醋酸緩衝液透析，在 5°C 下放置 24 小時，即得 8 字形結晶，產量每公斤綠豆約 150 毫克。

組份 A, B 抑制劑在溶解度性質上有所區別。前者在無鹽 pH 5 的水溶液中，幾乎全部沉下。在 pH 4 時，0.35 飽和的 $(NH_4)_2SO_4$ 即能使其沉澱完全。組份 B 對水溶解度很好(pH 6 以上)在較高的飽和 $(NH_4)_2SO_4$ 濃度下才能使其沉澱。

分別測定了抑制劑組份 A, B 對胰蛋白酶水解大分子底物(酪蛋白)和小分子底物(苯甲酰精氨酸胺和對甲基苯磺酰精氨酸甲酯)的抑制活力。在固定胰蛋白酶濃度下(用標準胰蛋白酶活力單位校正)加不同量抑制劑，當抑制程度在 80% 以內時，都是等當量抑

制,成直綫關係,即此時 K_i 值幾接近於無窮小,當抑制程度再增大時,抑制劑與胰蛋白酶又開始部分解離,從圖中可分別求出它們的 K_i 值及抑制劑與酶量在等當量抑制時的比值與全抑制時的比值,其結果見表:

綠豆胰蛋白酶抑制劑對胰蛋白酶水解不同底物時的某些綠豆胰蛋白酶
抑制劑對胰蛋白酶水解不同底物時的某些常數

| 底物 | 當量抑制時的比值 I : E | | 全抑制時的比值 I : E | | 抑制常數 $K_i M^{-1}$ | |
|------------|-------------------|-------|------------------|-------|----------------------|----------------------|
| | A | B | A | B | A | B |
| 酪蛋白 | 1:3.7 | 1:4.5 | 1:3.0 | 1:3.3 | 3.5×10^{-9} | 3.7×10^{-9} |
| 苯甲酰精氨酸胺 | 1:4.2 | 1:5.4 | 1:3.5 | 1:3.9 | 1.8×10^{-7} | 2.6×10^{-7} |
| 對甲苯磺酰精氨酸甲酯 | 1:4.6 | 1:5.5 | 1:3.5 | 1:3.8 | 0.7×10^{-9} | 1.0×10^{-9} |

根據以上在等當量抑制時抑制劑與酶量的重量比值中推算綠豆中二胰蛋白酶抑制劑的分子量約分別 6000 及 5000 左右。

與其他胰蛋白酶抑制劑不同的是:此綠豆中的二小分子抑制劑即使在過量三倍下對胰凝乳蛋白酶水解大底物都不抑制。

猪羊胰臟中若干蛋白水解酶的 提取、結晶與鑑定

戚正武 吳克佐 許實榮

(中國科學院生物化學研究所,上海)

雖然 Kunitz 和 Northrop 等自 1935 年以來陸續從牛胰臟中提取各種結晶蛋白水解酶:胰凝乳蛋白酶 A, B, 胰蛋白酶, 羧肽酶 A, B 以及它們相應的酶原,但相同的抽提方法並不適用於其他的哺乳類動物,因而迄今未曾從猪、羊胰臟中得到上述各種相應的結晶蛋白水解酶,雖然有一些酶已被純化。我們用簡便的方法從猪羊胰臟中提取若干結晶蛋白水解酶,得量很高。此外還從猪胰中得到三種活力尚未肯定的結晶蛋白。

取新鮮猪胰經絞碎後,立即用二倍體積冷的 $0.25 N H_2SO_4$ 抽提,過夜後,濾液取 0.2—0.5 飽和 $(NH_4)_2SO_4$ 的沉澱部分。濾餅溶於三倍水對 $0.01 M$ pH 5 醋酸緩衝液透析。俟透析完全後(約二日)離心去沉澱,清液用 0.6 飽和 $(NH_4)_2SO_4$ 沉澱。濾餅溶於三倍水中,加飽和 $(NH_4)_2SO_4$ 溶液至 0.25 飽和度,調 pH 至 6,在室溫下放置 ($25-30^\circ C$) 經 12 小時後即出現結晶,二、三日後結晶完全。結晶即為類胰凝乳蛋白酶 A,每公斤胰臟得 4 克,經三次重結晶後產量分別為 3.1, 2.5 及 2.2 克,但酶的比活力並未提高。

類胰凝乳蛋白酶 A 結晶後之母液調 pH 至 3, 即有沉澱 (I) 生成,過濾收集。濾液

用 0.8 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉澱，得濾餅 (II)，溶於十倍水，再加固體 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 0.25 飽和並調 pH 至 3，可得第二次少量沉澱 (I) 與前者合併，如此重複三次至無沉澱 (I) 生成爲止。將濾餅 (II) 溶於 0.4 M pH 9 硼酸緩衝液中，在 5°C 處放置，隔日即有結晶析出，即爲類胰凝乳蛋白酶 B，產生每公斤豬胰約 3 克。

將三次合併後之沉澱 (I) 溶於二倍水中，對 pH 4.5，0.01 M 含 0.25 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的醋酸緩衝液透析，在 5°C 處放置 24 小時，即得結晶蛋白，產量每公斤豬胰約 0.3 克其活力尙不能肯定，但不具有蛋白水解酶，羧肽酶，澱粉酶，DNAse，RNAse，胰蛋白酶抑制劑的活力。

將濾餅 (II) 以 25 倍體積 0.5 M HCl 溶解，在 90°C 下加熱處理 45 秒，立即冷卻，過濾去沉澱，濾液用 0.7 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉澱，對 0.2 M pH 8 含 0.4 飽和 MgSO_4 的硼酸緩衝液透析，在 5—10°C 處放置 24 小時，即得到結晶蛋白，產量每公斤豬胰約 0.4 克。其活力尙不能確定，略含有蛋白水解酶的活力。

將濾餅 (II) 溶於十倍水中，加等量 5% 三氯乙酸，於 80°C 水浴中加熱 5 分鐘，立即冷卻，去沉澱。濾液在 pH 3 下用 0.8 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉澱，濾餅於二倍水中溶解，在室溫下對 pH 5.5，0.25 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 透析，24 小時後即得結晶蛋白，產量每公斤豬胰約 0.3 克。其活力尙不清楚，略有胰蛋白酶抑制劑的活力。

用相似方法亦從羊胰中得到結晶胰凝乳蛋白酶，但所得的是酶原。在 pH 8 下可用牛胰蛋白酶或結晶母液來激活。產量每公斤羊胰約 2.5 克。

胰凝乳蛋白酶原結晶後之母液用 0.7 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉澱。濾餅在 pH 8，0.2 M 含 0.5 飽和 MgSO_4 的硼酸緩衝液中結晶，即得到胰蛋白酶酶原，產量每公斤羊胰約 2 克。激活後用同樣方法處理可得到胰蛋白酶的結晶。

分別測定了重結晶多次的豬類胰凝乳蛋白酶 A, B，羊胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的活力。大底物爲酪蛋白，小底物分別爲苯甲酰酪氨酸乙酯和對甲基苯磺酰精氨酸甲酯，並與相對應的牛胰臟中蛋白水解酶相比較。

在我們工作結束時看到新來期刊 "Arch Biochem & Biophys 97, 217, 1962 中，Thavis J. 和 Liener I. E. 的有關豬胰蛋白酶結晶的簡訊。

蛋白質功能基團的改變 與其生物活力的關係

II. 胰蛋白酶的硫硫鍵與其活力的關係

許根俊 鄒承魯

(中國科學院生化研究所, 上海)

鄒在前文中指出, Liener 用巯乙醇在 pH 7.6, 8 M 脲素溶液中, 還原胰蛋白酶的硫硫鍵, 當一個硫硫鍵被還原, 酶活力已全部喪失, 但其剩餘酶活力與硫硫鍵破壞個數的關係却表明胰蛋白酶硫硫鍵的必需數是三個。鄒指出這種不一致的現象可以用下面的理由來解釋; 即 (1) 在 Liener 所用實驗條件下有硫硫鍵的交換反應; (2) 胰蛋白酶是以三聚體的形式表現其酶活力; 此外巯乙醇除了還原硫硫鍵外也可能尚有其他作用點。我們用比較專一的硫硫鍵試劑亞硫酸鈉在對氯汞苯甲酸存在下破壞硫硫鍵, 由於對氯汞苯甲酸不斷地和反應中產生的巯基結合而避免了交換作用的發生, 因此在這樣的條件下可以更真實地反映硫硫鍵和活力的關係。

胰蛋白酶在中性溶液中極易自溶失活, 即使在 pH 6.3, 8 M 脲素溶液中在室溫放置時間較長也會有可察覺的變化。因此我們的實驗都在嚴格控制胰蛋白酶活力不變的條件下進行, 分別在 pH 6.3, 8 M 脲素溶液中於 0 度及 28 度以亞硫酸鈉作用於硫硫鍵。在分析硫硫鍵破壞的同時測定胰蛋白酶水解血紅蛋白, 對甲苯磺酰精氨酸甲酯及苯甲基精氨酸的活力, 都得到 $\sqrt[3]{a}$ 與巯基的出現有直線關係。並且用以上三種底物測定剩餘活力與巯基出現的關係也是平行的。比較 0 度與 28 度得到的結果可以看出 0 度當 3 個巯基出現 $\sqrt[3]{a} = 0$, 而 28 度 6 個巯基出現 $\sqrt[3]{a} = 0$ 。

上面的結果表明在我們的實驗條件下, 必需的硫硫鍵數是 3 而不是 1, 當活力全部喪失時硫硫鍵的破壞數在 0 及 28 度分別為 3 及 6。0 度與 28 度不同的結果說明在 0 度時可能有兩類具有不同反應速度的硫硫鍵, 其中易於反應的三個是維持活力所必需的。28 度的結果表明在 0 度不易反應的三個硫硫和亞硫酸鈉作用的溫度係數較大, 當溫度上升時反應速度增加較快, 在 28 度時所有的硫硫鍵對亞硫酸鈉的反應速度大體相同。Sanger 與 Jensen 等指出在 pH 近中性的溶液中巯基的存在能促進硫硫鍵交換。Liener 用 8 M 脲素和過量的硫醇來還原胰蛋白酶正是應用了一個有利於交換的條件, 可以想像當一個必需的硫硫鍵被破壞時, 另外兩個必需的硫硫鍵已經因為交換而發生了變化, 就會出現 $\sqrt[3]{a}$ 與巯基成直線關係, 和當一個硫硫鍵被破壞活力全部喪失的結果。

另一方面從胰蛋白酶三種具有代表性的活力和硫硫鍵破壞的關係一致性來看, 胰蛋白酶對於三種不同類型的底物的作用雖然也還可能有不同的要求, 但對於催化這三種底物分解所要求的空間構型却是一致的。如果能進一步肯定必需硫硫鍵的位置, 將會對胰蛋白酶活性中心空間構型的了解提供有用的知識。

蛋白質功能基團的改變 與生物活力的關係

III. *P*-硝基-*W*-溴代苯乙酮對某些蛋白質 活力的影響

鄒承魯 孫玉琨 許根俊 杜雨蒼

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

在討論改變蛋白質功能基團與其生物活力的定量關係時,我們曾經指出,常能根據已被改變的側鏈基團總數的測定,判斷蛋白質的必需基團數。此時如果所用試劑含有發色基團,就能準確和方便地進行上述測定。在另一方面,溴代乙酸近年來已被廣泛地應用於蛋白質側鏈基團的改變上。我們在尋找既具有溴代乙酸的某些性質又含有發色基團的試劑時,發現 *P*-硝基-*W*-溴代苯乙酮 (NBAP) 對於許多蛋白質的生物活力有明顯的影響。

當胰凝乳蛋白酶與 NBAP, $79 \mu\text{M}$ 在 pH 5, 37 度保溫一小時後,酶活力受抑制 90% 左右。如果在酶與 NBAP 共同保溫時,同時含有胰凝乳蛋白酶的競爭性抑制劑,二氫肉桂酸, 17mM 時抑制程度即降低至 45% 左右。競爭性抑制劑二氫肉桂酸的顯著保護作用,說明 NBAP 可能作用於酶的活力中心上。NBAP 對木瓜蛋白酶的抑制更是十分顯著,當抑制劑濃度為 $1 \mu\text{M}$, 與酶當量時,在 pH 5 保溫半小時,雖然有過量半胱氨酸存在,酶活力受抑制也達到 90% 左右。對於核糖核酸酶 NBAP 的抑制比溴代乙酸更強,當酶與濃度為 6mM 的 NBAP 在 pH 7 保溫 1 小時後,活力受抑制達 99% 以上。胰島素與 6mM NBAP 在 pH 8 作用 3 小時後其活力也受抑制 70%—90%。當 NBAP 與胰凝乳蛋白酶或胰島素作用後,其光吸收性質發生改變,差吸收高峯分別在 355 及 $380 \text{m}\mu$ 。胰凝乳蛋白酶活力的降低與 $355 \text{m}\mu$ 處光吸收的增加成平行關係。

從以上結果看來 NBAP 是一個有希望的改變蛋白質側鏈基團的試劑。其作用方式可能和溴代乙酸有某些類似之處。並且根據上述四種蛋白質的氨基酸組成和與 NBAP 的反應條件,組氨酸殘基也是一個必需考慮的可能作用點。

在過量巰基化合物存在時 蛋白質巰基的測定

杜雨蒼 鄒承魯

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

蛋白質硫硫鍵為巰基乙酸等還原劑還原的變化過程, 由於大量還原劑的存在, 不易準確測定。一般使用的辦法是: 先使蛋白質沉澱, 反覆洗滌以除去過量還原劑後再行測定。此方法之缺點是難以完全避免巰基的自動氧化, 因而測得數值可能不反映真實情況。我們利用萘醌在大量還原劑存在時直接測定了巰基的變化。

我們首先觀察了萘醌和巰基化合物如乙硫醇、巰基乙酸、谷胱甘肽、還原型胰島素等的反應情況。在 pH 5 的甲醇水溶液內, 萘醌和它們有當量加成關係。加成物在波長 420 m μ 左右有一新的吸收峯。在同一測定條件下吸收峯高度和此產物濃度的關係符合 Beer's 定律。改變測定時的系統會對此吸收峯位置及高度發生影響, 在 pH 5 的甲醇、水溶液中甲醇濃度越大吸收峯越高, 在 75% 甲醇溶液中比在無甲醇的水溶液中, 消光係數 (415 m μ) 要增高 20% 左右。水溶液的酸鹼度對高峯位置及形狀有更大影響, 如巰基乙酸-萘醌加成物的吸收峯位置在 2 NH₂SO₄ 中在 405—410 m μ ; 在 pH 5 內則為 420—425 m μ 且形狀比較突起。谷胱甘肽-萘醌加成物在 415 m μ 波長。在 pH 5、75% 甲醇溶液中中和在 18 N 硫酸中的毫克分子消光係數分別為 2.7 mM⁻¹ 和 1.9 mM⁻¹。不同的巰基化合物與萘醌結合後吸收峯位置與消光係數大致相同, 在 18 N 硫酸中皆在 425 m μ 左右。在此條件下對於胰島素、胰島素 A 鏈、核糖核酸酶及胰凝乳蛋白酶的衍生物而言, 每一巰基的毫克分子消光係數皆為 1.9 mM⁻¹。

巰基化合物和萘醌的反應產物在水及乙醚內的溶解性質由巰基化合物本身所帶電荷的性質決定, 如乙硫醇-萘醌加成物易溶於乙醚不溶於水, 巰基乙酸-萘醌加成物在中性溶於水, 酸性則溶於乙醚, 而谷胱甘肽和胰島素與萘醌的加成物則不溶於乙醚。利用這些性質可以測定蛋白質的硫硫鍵被過量的巰基化合物, 例如巰基乙酸, 還原為巰基的程度, 即在過量巰基乙酸存在時加入萘醌充分反應後, 調溶液至酸性, 以乙醚抽提除去巰基乙酸-萘醌加成物、二羧甲基二硫化物以及過量的萘醌, 而蛋白質巰基與萘醌所生成的加成物則留在水溶液中, 即可以用上述比色方法測定。根據這一原理, 我們首先測定了與過量巰基乙酸同時存在的還原型谷胱甘肽, 得到的結果與後者單獨測定時完全相同。應用此法測定胰島素被過量 20 倍巰基乙酸在 37 度 pH 5 8 M 脲素水溶液內還原的過程, 結果說明胰島素三個硫硫鍵在 10 小時內可以定量地轉變為巰基。

萘醌-巰基乙酸加成物經過分離提純, 可以在甲醇中得到長針狀黃色結晶。

(韓沾元和張文尙同志參加部分工作特此致謝)

醛縮酶的活性中心

伍欽榮 時婉勤

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

Dreschler 等用羧肽酶處理醛縮酶, 發現在水解除去三個末端酪氨酸以後催化果糖-1,6-二磷酸分解的活力喪失了 93%, 而催化果糖-1-磷酸分解的活力不受損失。他們認為酪氨酸是否酶的活性中心缺少具體的實驗證據。

根據我們的研究結果醛縮酶經羧肽酶處理以後, 殘存活力不再受競爭性抑制物果糖-6-磷酸所抑制, $K_i = \infty$, 說明醛縮酶上的末端酪氨酸被切除以後即喪失了和果糖-6-磷酸結合的能力。此外我們還觀察到底物果糖-1,6-二磷酸能保護醛縮酶不受羧肽酶水解。因此我們認為末端酪氨酸是醛縮酶的活性中心的一部分, 酶通過它和底物果糖-1,6-二磷酸及競爭性抑制物果糖-6-磷酸分子上的-6-磷酸部分結合, 這個結果不支持 Mehler 提出的底物通過酶分子上鹼性基團與酶結合的假說。

利用鄒承魯新近提出的計算必需基團的方法計算, 醛縮酶的三個末端酪氨酸中有二個是酶的活性中心。

牛脾酶制劑催化白氨酸聚合 作用的初步研究

孫玉琨 黃祥英

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

組織蛋白酶廣泛存在於動物的肝、脾、腎等組織中。Bergmann 及 Frnton 等以部分提純的牛脾抽提液作用於不同的合成底物, 指出細胞內至少有三種類型的蛋白水解酶, 稱為組織蛋白酶 A, B, C 此外細胞內還有氨肽酶, 甘氨酸三肽酶等, 在半胱氨酸存在下牛脾制劑對白氨酸也有水解作用。最近 Press 報導從牛脾中分離出蛋白水解酶 D 類, Lewell 也發現有需要半胱氨酸激活的羧肽酶等。看來組織蛋白酶可能不止目前已知的幾種。

我們發現牛脾酶制劑在 pH 7.8 及半胱氨酸存在下能催化白氨酸的聚合作用, 反應過程中除不斷有游離氨的釋放外, 並逐漸生成白色沉澱。測定結果, 參與反應的白氨酸的 60% 形成聚白氨酸。聚白氨酸的分子量在 1700—2000 左右。聚合物不溶於水, 酸或鹼及一般有機溶劑, 但可溶於苯酚或甲酚。從氫離子濃度的影響看來, pH 6—8 範圍內皆具有催化白氨酸聚合作用。反應過程中半胱氨酸的激活是必要的, 對氯苯汞甲酸有

抑制作用。根據抑制劑, pH, 溫度等不同因素對催化白氨酸胺聚合作用和對已知的組織蛋白水解酶類的影響皆不相同看來, 牛脾酶制劑催化白氨酸胺聚合作用可能是一個新的酶。

(中文是在鄒承魯先生指導下進行的, 謹誌深切謝意)

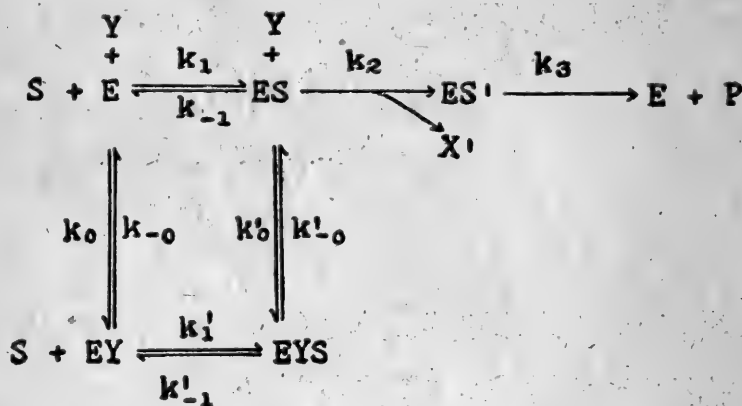
抑制劑影響生成酶酰化物為中間物 系統的動力學

許根俊 鄒承魯

(中國科學院生化研究所, 上海)

基於 Michaelis-Menten 最簡單的假定, 酶作用於一個底物, 形成一個中間物, 在抑制劑存在下的動力學方程已見於 Botts 與 Morales 的推導。對於一些水解酶如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶及乙酰胆鹼酯酶, 有證據認為它們除了生成米氏絡合物以外, 尚存在有酶酰化中間物。為了適應這一類的情況, 我們用恆態的方法處理了包含兩個酶中間物反應受抑制劑影響的動力學方程。

如果 Y 只影響米氏絡合物的進一步變化而不影響底物的結合, 及我們可以忽略 ES' 的逆反應。則有:



其中 E 為自由酶; ES 為米氏絡合物; ES' 為酶酰化中間物; Y 為抑制劑, EY 為酶與它結合的二元絡合物, EYS 為三元絡合物。以及:

$$K'_0 = k'_0/k'_{-0} \qquad K_0 = k_0/k_{-0}$$

$$K_1 = k_1/k_{-1} \qquad K'_1 = k'_1/k'_{-1}$$

$$\bar{K} = k_1/(k_{-1} + k_2)$$

則:

$$V = \frac{k_3 e_0 \left(\frac{k_2}{k_3} \bar{K}S + \frac{\Delta ES'}{\Delta} \right)}{1 + \bar{K}S + K_0 Y + K_0 \bar{K}SY + \frac{k_2}{k_3} \bar{K}S + \frac{\sum \Delta i}{\Delta}} \quad (1)$$

其中各微擾項 Δi 的行列式都含有 D ，在 $D=0$ 時，才有 $\Delta i=0$ ，此時 $1/V$ 對 $1/S$ 作圖有簡單的直綫關係。反言之，如果 $1/V$ 對 $1/S$ 作圖有直綫關係，只能是 $D=0$ 。

$$D = (\bar{K} - K_1) k'_{-1} K'_0 SY \quad (2)$$

得下面四種情況可使 (2) 等於零：

1. 無抑制劑存在， $Y = 0$ ，此時 (1) 式還原為熟悉的 Gutfreund 方程。

$$V = \frac{k_3 e_0 S}{\frac{k_3 (k_{-1} + k_2)}{k_1 k_2} + \frac{(k_2 + k_3)}{k_2} S} \quad (3)$$

2. $K'_0 = 0$ ，有 $k_0 = 0$ 或 $k'_1 = 0$ ；即 Y 不表現抑制作用，或表現為競爭性抑制。

3. $k'_{-1} = 0$ ，有二種可能：

(1) $k'_{-1} = 0$ ， $k'_1 = 0$ ， EY 與 EYS 之間的途徑不存在；

(2) $k'_{-1} = 0$ ， $k'_1 \neq 0$ ， EY 變成 EYS 為不可逆；

對於第一種情況特別是當抑制劑為小分子物質時，位阻效應很小，並不會因為結合次序的改變而太大的影響與底物的結合，第二種情況則有 $K'_1 = \infty$ ，根據熱力學的要求必須 $K_1 = \infty$ ， K'_0 和 $K_0 = 0$ 或 $K_0 = 0$ 。事實上 K_1 和 K_0 都不能滿足此條件。因此，這兩種情況都不能成為 $1/V$ 對 $1/S$ 作圖有簡單直綫關係的依據。

$1/V$ 對 $1/S$ 作圖有簡單直綫關係，而且又不是競爭性抑制，最可能的情况必須是：

4. $\bar{K} = K_1$ ，也就是 $k_2 \ll k_{-1}$ 。在 $k_2 \ll k_3$ 時，當抑制劑的作用為非競爭性抑制時，必須是米氏常數等於米氏化合物的解離常數。這時 E 、 EY 、 ES 、 KYS 是處於一個類平衡狀態，亦即 Botts 與 Morales 的討論也能適用於生成兩個中間物的酶反應系統。

利用放射性 32 磷研究以皮質素誘導 大鼠肝色氨酸吡咯酶時肝中酸溶性 磷酸化合物變化的初步報導

吳文俊 指導人：張惠珠

(上海第二醫學院生化教研組)

大鼠肝色氨酸吡咯酶 (Tryptophan pyrrolase) 的活性可以在許多因子作用 1—4 小時後顯著增高。以往通常認為這一種現象是屬於酶的誘導生成，並將其生成歸結於二種不同的類型——專一的基質誘導和通過腎上腺分泌產物的激素誘導。關於色氨酸吡咯酶誘導生成的機制目前尚無一致意見，Horton、Feigelson、Donald 等人均證明色氨酸吡咯酶的誘導生成是酶蛋白分子淨合成的增加。但近年來 Greengard 等 (1961 年) 發現當色氨酸誘導色氨酸吡咯酶時，微粒體中含鐵卟啉輔基的濃度有所增加，從而提出了輔基激活的作用機制。而 Pitot 等 (1961 年) 通過體外研究認為基質升高色氨酸吡咯酶活力的作用是一個依賴能量的過程。先前 Ефимочкина 亦曾報導肝切片的色氨酸吡咯酶基質誘導可能被引起氧化磷酸化解聯，但不影響呼吸的這一濃度的二硝基酚所抑制。在激素方面；Goodlad 及其同事 (1959 年) 曾證明皮質素對肝蛋白合成代謝的影響多少依賴於食物中能量的攝入水平。

爲了試圖進一步地探討在激素作用下色氨酸吡咯酶活力增高與能量代謝的關係，在當前的工作中我們利用了放射性 32 磷來研究大鼠經皮質素處理後，肝色氨酸吡咯酶活性增高期間肝中酸溶性總磷和 ATP-ADP 不穩定磷的變化。同時對肝中 ATP-ADP 不穩定磷和酸溶性總磷含量的變化亦作了比較性的觀察。

實 驗 方 法

將成年、同性、體重在 140—180 克的大鼠以配對法分成誘導和對照二組。誘導組動物在殺死前一小時或四小時腹腔一次注射醋酸皮質素 (5 毫克/100 克體重) 以及在不同時間腹腔注射 $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ (20 微居里/100 克體重) 一次。對照組除腹腔注射 0.5 毫升生理鹽水以代替皮質素外，其它處理均與誘導組相同。兩組動物均經絕食 20 小時。

根據文獻資料，在正常動物 32 磷進入肝細胞後即非常迅速地參入到 ATP-ADP 的不穩定磷基團之中，在數分鐘內即與肝細胞中的無機磷- ^{32}P 達到平衡。因而在當前的實驗條件下不能用 ATP-ADP 的相對比放射性這一指標來判斷 ATP-ADP 更新速度的變化。本文僅測定了肝 ATP-ADP 不穩定磷和酸溶性總磷的比放射性 (簡稱 S. A)，然後根據計算得到肝 ATP-ADP 不穩定磷的相對放射性 (簡稱 R. A = $\frac{\text{ATP-ADP 不穩定磷的脈沖數/分/克肝}}{\text{酸溶性總磷微克數/克肝}}$) 和 ATP-ADP 不穩定磷的 S. A 與酸溶性

總磷的 S. A 之比 (簡稱 R. S. A = $\frac{\text{ATP-ADP 不穩定磷 S. A}}{\text{酸溶性總磷 S. A}}$)。

ATP-ADP 的分離是採用 Fiske (1934 年) 提出的木炭吸附法略加修改。所用木炭為 E. Merck 制, 並經證明吸附性能良好, 吸附率在 80%, 洗脫液改用稀三氯醋酸 (2.5%) 可獲較滿意的結果。

ATP-ADP 不穩定磷用 1N HCl 在 100°C 水解 10 分鐘釋出, 定磷按改良的 Kutner 與 Cohen 法進行測定。

取放射性樣品 0.2 毫升鋪於鋁碟, 烘乾後用蓋革——繆勒計數管國產 (復旦 6021) 64 進位定標器進行計數, 計數時間使其標準誤不大於 5%。本底一般在 20 左右。

結果與討論

在注射皮質素一小時和四小時後鼠肝酸溶性總磷和 ATP-ADP 不穩定磷放射性的變化資料列於表 1, 其動態變化由圖 1, 2 中表明 (圖略)。由表 1 及圖 1 中可看出誘導組大鼠不論在皮質素注射後一小時或四小時其 ATP-ADP 不穩定磷的 S. A 在 32 磷注入 60 分鐘時均比對照組略高, 後者在 32 磷注入後 120 分鐘仍繼續上升而誘導組已開始下降, 且在 32 磷注入後 240 分鐘時, 四小時誘導組動物的肝 ATP-ADP 不穩定磷 S. A 亦較對照組為低。以上差別在皮質素作用四小時的大鼠組較為明顯, 但在統計學上均無顯著差別 ($P > 0.05$)。酸溶性總磷 S. A 在二組動物之間基本相似。由圖 2 中所顯示出的在 32 磷注入不同期間 ATP-ADP 不穩定磷 R. A 之變化與 ATP-ADP 不穩定磷 S. A 之變化相類似。此外從表 2 中可看到肝 ATP-ADP 不穩定磷的含量在 32 磷注入不同期間, 誘導組多數均比對照組為高, 按平均含量計算, 在皮質素作用四小時時增高甚為明顯 ($P < 0.05$ 接近 0.01)。酸溶性總磷含量在誘導組雖亦比對照組稍高, 但並無顯著差別。以上結果表明在給予大鼠注射皮質素後一小時, 尤其是四小時當色氨酸吡咯酶生成旺盛時, 肝含磷高能化合物的代謝有些變化趨勢。這些變化趨勢我們認為包括高能化合物轉換率增高的可能性。固然在沒有無機磷 S. A 的情況下, ATP-ADP 不穩定磷的 S. A 尚可反映無機磷進入肝細胞的速度, 但由 ATP-ADP 不穩定磷 R. A 的變化來看, 後種可能性較小。這一見解是與 Derahe 等 (1957 年) 利用 32 磷研究皮質素對腎上腺皮質切除大鼠肝 ATP 合成的影響中發現有明顯的加速作用是相一致的。

此外 R. S. A 在誘導組和對照組之間並無明顯不同, 由於酸溶性總磷的 S. A 包括肝中其它含磷化合物的 S. A, 所以它指出皮質素對肝 ATP-ADP 的穩定磷和其它酸溶性磷酸酯類的代謝沒有顯著影響。

皮質素對於肝中含磷化合物的作用趨勢, 使我們相信皮質素促使色氨酸吡咯酶活力的增加是一個依靠能量的過程。根據 Greengard (1961 年) 等的意見, 皮質素的作用是促進肝中色氨酸吡咯酶蛋白的合成, 而 Goodlad 等 (1959 年) 曾發現皮質素引起肝蛋白合成代謝的增加多少依賴於食物中的能量攝入水平。所以我們認為由皮質素所促進的能量代謝的加強, 係為了保證肝中酶蛋白的合成。

為了進一步地證明這一見解, 我們認為今後有必要繼續重覆這一實驗, 並可考慮利用一些阻止含磷高能化合物的物質作較深入一步的探討。

表 1 注射皮質素後大鼠肝中 ATP-ADP 的不穩定磷及酸溶性總磷放射性的變化

| 皮質素注射後時間 | ³² P 注射後時間 (分) | 大鼠數量 | 對 照 組 | | | 誘 導 組 | | | | |
|----------|---------------------------|------|--------------|------------|-------|-----------|--------------|------------|-------|-----------|
| | | | ATP-ADP S. A | 酸溶性總磷 S. A | R. A* | R. S. A** | ATP-ADP S. A | 酸溶性總磷 S. A | R. A* | R. S. A** |
| 一 小 時 | 60 | 6 | 365±31 | 176±21 | 33±9 | 2.09±0.27 | 385±26 | 198±24 | 41±8 | 1.97±0.24 |
| | 120 | 10 | 420±137 | 188±41 | 32±12 | 2.16±0.62 | 393±105 | 192±38 | 33±11 | 2.08±0.52 |
| | 240 | 8 | 328±125 | 166±28 | 26±5 | 2.21±0.17 | 333±36 | 151±15 | 27±3 | 2.22±0.36 |
| 四 小 時 | 60 | 10 | 430±62 | 206±27 | 31±6 | 2.13±0.41 | 444±111 | 218±32 | 33±9 | 2.13±0.54 |
| | 120 | 7 | 471±116 | 189±55 | 29±10 | 2.61±0.40 | 437±137 | 203±68 | 33±8 | 2.17±0.54 |
| | 240 | 10 | 438±129 | 172±43 | 29±6 | 2.65±0.93 | 372±105 | 164±34 | 27±6 | 2.37±0.76 |

* R. A = $\frac{\text{ATP-ADP 不穩定磷冲數/分/克肝}}{\text{酸溶性總磷冲數/克肝}}$

** R. S. A = $\frac{\text{ATP-ADP 不穩定磷 S. A}}{\text{酸溶性總磷 S. A}}$

表 2 注射皮質素後大鼠肝中 ATP-ADP 的不穩定磷及酸溶性總磷含量的變化

| ³² P 注射後時間 (分) | 大鼠數量 | 注 射 皮 質 素 後 一 小 時 | | | 大 鼠 數 量 | 注 射 皮 質 素 後 四 小 時 | | |
|---------------------------|------|-----------------------------|-----------------------|---------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | | 對 照 組 | 誘 導 組 | 大 鼠 數 量 | | 對 照 組 | 誘 導 組 | |
| | | ATP-ADP (不穩定磷 γ /克肝) | 酸溶性總磷 (γ /克肝) | | ATP-AEP (不穩定磷 γ /克肝) | 酸溶性總磷 (γ /克肝) | ATP-ADP (不穩定磷 γ /克肝) | 酸溶性總磷 (γ /克肝) |
| 60 | 6 | 72±9 | 812±95 | 10 | 58±7 | 817±110 | 65±11 | 896±173 |
| 120 | 10 | 63±12 | 776±40 | 7 | 52±7 | 856±76 | 67±9 | 856±103 |
| 240 | 8 | 60±14 | 792±85 | 10 | 56±10 | 796±112 | 64±16 | 822±136 |
| 總 計 | 24 | 165 | 2680 | 27 | 166 | 2471 | 196 | 2514 |
| 平 均 | — | 63±5 | 793±28 | — | 56±6 | 823±40 | 65±7 | 898±14 |

大白鼠注射皮質素後肝糖元異生作用 和組織谷丙轉氨酶活力的關係

潘碧霞 指導人：張惠珠

(上海第二醫學院生化教研組)

二十多年前 Long 等發現給飢餓大鼠注射腎皮抽提物能引起動物尿氮排出增加和肝糖元沉積，從而指出這類動物的蛋白降解和糖元新生之間的密切關係。後來許多學者的工作在這方面給以證實和補充，並由 Silber 等 (1953 年) 證明皮質素特別能促進肝外蛋白質 (肌肉蛋白) 的降解。近幾年來 Rosen 等人發現糖類固醇對肝谷丙轉氨酶 (GPT) 活力有特異的增高作用，臨床上亦看到接受皮質素治療的病人和柯興氏症患者血中丙酮酸和乳酸含量增高，因此一部分人認為腎皮類固醇對糖與蛋白質的作用可能是升高肝谷丙轉氨酶活力，使大量生糖氨基酸轉變成三炭化合物 (丙酮酸、乳酸) 供作新生糖元的原料。但另一方面，Engel (1950 年) 的實驗結果說明皮質素在 3 小時內不能促進蛋白質降解，Hess 等人 (1957 年) 認為皮質素不能促進三炭化合物直接形成糖元。Long 等最近 (1960 年) 的工作證明糖類固醇的糖元沉積作用是由於抑制了周圍組織對葡萄糖的利用。總之，糖類固醇的作用機制問題；包括新生糖元之來源以及它們的作用點問題是值得深入研究的。

本實驗試圖通過觀察大鼠接受一次大量皮質素注射後肝糖元含量、血丙酮酸含量和肝、肌谷丙轉氨酶活力的變化相互關係和時間關係，以探討皮質素的原始作用點問題。

實驗方法

大白鼠體重 140—180 克，按配對設計，隨機化分組。一組實驗動物給以一次腹腔注射醋酸皮質素 (Cortisone Roussel) 125 毫克/公斤體重，一組對照動物腹腔注射同體積的生理鹽水。所有動物均於禁食後 24 小時殺死作各指標測定，但動物注射皮質素時間分批為禁食後第 21, 19, 16, 8 小時，使各批動物殺死時間為注射藥物後第 3, 5, 8, 16 小時。組織谷丙轉氨酶活力測定按 Tonhazy 等 (1950 年) 比色法改良，改良後使空白顏色減低，讀數穩定及操作方便。血丙酮酸測定按 Friedemann (1943 年) 比色法改良。肝糖元定量用 Vanaer Vies (1954 年) 方法測定其中三氯醋酸可抽提糖元量。

結果與討論

實驗結果見附表。

從表列可見：

1. 大鼠注射皮質素 3 小時後肝糖元升高已達非常顯著 ($P < 0.01$) 此時伴有血丙酮酸含量顯著降低 ($P < 0.05$)，但肝糖元於注射後第 16 小時仍維持於高水平，而血丙酮酸含量從注射後第 5 小時起相反顯著增高。

附表 正常飢餓大鼠注射皮質素後肝糖元含量、血丙酮酸含量和肝、肌谷丙轉氨酶活力的變化

| 注射皮質素後 小時 | 肝 糖 元 含 量 | | | | 血 丙 酮 酸 含 量 | | | |
|--------------|-----------|------------------|--------|-------|-------------|-------------------------|-------|-------|
| | 動物 對數 | 增 高 值* (mg/g) | t** | P | 動物 對數 | 增 高 值 (mg/100 ml 全血) | t | P |
| 3 | 8 | 0.41±0.32 | 3.660 | <0.01 | 8 | -1.36±1.27 | 3.042 | <0.05 |
| 5 | 5 | 1.41±0.48 | 6.831 | <0.01 | 8 | 0.98±0.65 | 4.298 | <0.01 |
| 8 | 4 | 20.69±3.97 | 10.396 | <0.01 | 7 | 1.27±0.94 | 3.628 | <0.05 |
| 16 | 8 | 6.73±5.68 | 3.365 | <0.05 | 8 | 1.34±1.60 | 2.380 | <0.05 |

| 注射皮質素後 小時 | 肝 谷 丙 轉 氨 酶 活 力 | | | | 肌 谷 丙 轉 氨 酶 活 力 | | | |
|--------------|-----------------|------------------------|-------|-------|-----------------|------------------------|------|-------|
| | 動物 對數 | 增 高 值 (mM PA/g/hr.) | t | P | 動物 對數 | 增 高 值 (mM PA/g/hr.) | t | P |
| 3 | 8 | 0.06±0.43 | 0.397 | >0.05 | 7 | 0.026±0.21 | 0.11 | >0.05 |
| 5 | 10 | 2.18±1.97 | 3.499 | <0.01 | 10 | -0.021±0.21 | 0.31 | >0.05 |
| 8 | 7 | 1.58±0.92 | 4.579 | <0.01 | 7 | 0.061±0.16 | 1.00 | >0.05 |
| 16 | 8 | 1.84±2.66 | 1.965 | >0.05 | 8 | -0.070±0.25 | 0.77 | >0.05 |

註：* 增高值計算：

$$\bar{X} = \frac{\sum (X_1 - X_2)}{n} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

X_1 = 注射皮質素動物指標測定值

X_2 = 注射生理鹽水動物指標測定值

$X_i = X_1 - X_2$

n = 所用動物對數

$$** \text{ 配對 } t = \frac{\bar{X}}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

2. 肝谷丙轉氨酶活力在注射皮質素後5小時開始顯著升高,至16小時和對照動物無顯著差別。

3. 肌谷丙轉氨酶活力在注射皮質素後16小時內無顯著變化。

從實驗結果看出在本實驗條件下,皮質素引起的大鼠肝糖元沉積主要是來自動物體內的三炭化合物,而肝谷丙轉氨酶活力增高補充了三炭化合物的量加強了糖元新生。實驗未能證明皮質素對肝外蛋白的降解作用,但即使有作用也不是作用在肌谷丙轉氨酶上,而可能作用在蛋白質降解為氨基酸的過程,供給肝谷丙轉氨酶作用基質。

關於皮質素對新糖形成的作用點,我們認為可能作用於丙酮酸合成糖元的過程中的某些有關的酶系統,改變了它的活力或組合情況,所以促進了該反應的進行,而在肝谷丙轉氨酶上升。血丙酮酸量上升後,由於大量基質存在,使上述反應更為加速。至於肝谷丙轉氨酶活力增高的現象,可能是皮質素直接作用的結果,只是時間上比上面的過程延遲一些,也可能是肝三炭化合物含量下降引起的一種補償誘導結果。

應用 S^{35} -甲硫氨酸探討晚期血吸蟲病 低清蛋白血症的形成機制

何開玲 呂懿娟 邵光第 李亮

(上海第一醫學院生物化學教研組)

爲了探討晚期血吸蟲病低清蛋白血症的形成機制,採用了標記甲硫氨酸,在受感染血吸蟲的家兔身上,進行氨基酸的吸收及參入血漿蛋白的示踪實驗。

取健康家兔 22 只,分三組進行試驗:

1. 非示踪組 12 只。取其中 6 只接種日本血吸蟲尾蚴 1000 條,其餘 6 只不予感染,作爲正常對照。在大約接種一個月(5 周)及三個月(13 周)後,抽取各動物的耳靜脈血液各一次,進行血漿蛋白的分離與測定。結果列於表 1。

表 1 正常及感染血吸蟲家兔血漿蛋白的含量

| 樣品 | | 總蛋白 (g%) | 清蛋白 (g%) | 球蛋白 (g%) | 清蛋白/球蛋白 |
|--------|--------|-------------|-------------|-------------|---------|
| 正 常 兔 | | 7.08 | 4.32 | 2.7 | 1.58 |
| 感染血吸蟲兔 | 5 周 後 | 7.37 | 3.78 | 3.59 | 1.06 |
| | 13 周 後 | 7.92 | 2.07 | 5.85 | 0.35 |

2. 注射組動物 6 只。取其中 3 只接種血吸蟲,其餘作爲正常對照。接種三月後進行示踪試驗,每一動物按每公斤體重腹腔注入 0.15 毫居里之 S^{35} -甲硫氨酸生理鹽水溶液。

3. 口飼組動物 4 只。其中 2 只爲受感染兔,2 只爲正常對照。每一動物按每公斤體重用胃管灌飼 0.3 毫居里的 S^{35} -甲硫氨酸。

表 2 注入 S^{35} -甲硫氨酸後不同時間內血漿蛋白的比放射性

$$\left(\frac{\text{每克血漿蛋白質的計數率}}{\text{每克兔體重注入的計數率}} \right)$$

| 樣品 注入甲硫氨酸後間隔時間(小時) | 正 常 兔 | | 血 吸 蟲 病 兔 | |
|-----------------------|--------|--------|-----------|--------|
| | 清 蛋 白 | 球 蛋 白 | 清 蛋 白 | 球 蛋 白 |
| 0 | 7.65 | 1.01 | 3.75 | 2.01 |
| 4 | 7.66 | 23.03 | 4.57 | 7.18 |
| 8 | 10.70 | 30.62* | 4.60 | 11.49 |
| 24 | 12.78* | 26.98 | 6.95 | 17.10 |
| 48 | 12.72 | 25.80 | 11.36* | 17.53 |
| 96 | 8.95 | 13.06 | 8.35 | 22.83* |
| 144 | — | — | 6.65 | 9.15 |

* ——比放射性的最大值。

表3 口飼 S^{35} -甲硫氨酸後不同時間內血漿蛋白的比放射性

(每克血漿蛋白質的計數率)
(每克兔總體重服入的計數率)

| 服入甲硫氨酸後間隔時間(小時) | 正 常 兔 | | 血 吸 蟲 病 兔 | |
|-----------------|--------|--------|-----------|--------|
| | 清 蛋 白 | 球 蛋 白 | 清 蛋 白 | 球 蛋 白 |
| 0 | 1.81 | 1.83 | 0.47 | 0.67 |
| 8 | 24.52 | 62.60* | 12.23 | 31.49 |
| 24 | 26.77 | 61.39 | 12.29 | 31.68* |
| 96 | 30.15* | 58.06 | 19.86* | 20.01 |
| 144 | 28.85 | 30.14 | 14.47 | 18.21 |

* ——比放射性的最大值。

後二組動物在接受示踪氨基酸後 0, 4, 8, 24, 96, 144 小時, 由耳靜脈抽取血樣, 製成放射性血漿蛋白樣品, 測定其比放射性, 結果列於表 2, 3 中, 此外, 收集口飼組動物之每 24 小時糞便, 測定其中放射性, 算出每日排出放射性物質佔餵入放射性氨基酸的百分比數, 結果列於表 4。

表4 口飼 S^{35} -甲硫氨酸後每日糞中排洩量之百分率

($\frac{\text{糞中總計數}}{\text{服入總計數}} \times 100$)

| 天 數 | 樣 品 | 正 常 兔 | 血 吸 蟲 病 兔 |
|-----|-----|-------|-----------|
| 1 | | 0.17 | 0.29 |
| 2 | | 0.27 | 0.22 |
| 3 | | 0.20 | 0.03 |
| 4 | | 0.01 | 0.74 |
| 5 | | 0.00 | 0.96 |
| 6 | | — | 0.48 |

從以上實驗結果可以看出: 家兔在嚴重感染血吸蟲後, 血漿清蛋白含量逐漸下降, 而球蛋白的含量增加, 因而清蛋白與球蛋白的比值發生變化。13 周後清蛋白平均含量只有 2.07g%, 清蛋白球蛋白比值自 1.58 降至 0.35 (表 1)。此結果與許多文獻中的報導相似, 顯然清蛋白含量以及清蛋白球蛋白的比值下降。

在示踪實驗中, 我們發現, 注射 S^{35} -甲硫氨酸後, 血漿蛋白的比放射性隨着注射後的間隔時間逐漸上升, 達到高峯後, 又逐漸下降。病兔的血漿清蛋白與球蛋白的比放射性, 在大多數時間內皆較正常兔為低, 而且最高值的出現時間相應地推遲。如正常家兔的血漿清蛋白的比放射性在注射後 24 小時達到最高值 12.78, 而感染兔之血漿清蛋白在注射後 48 小時方才達到最高值 11.36。正常家兔之血漿球蛋白, 在注射後 8 小時已達到最大比放射性值 30.62, 感染兔之最大比放射性到 96 小時方才出現, 口飼組的示踪試驗與注射組有相似結果。雖然家兔在感染血吸蟲後, 兩種血漿蛋白質都顯示出最大比放射性低於正常。但考慮了它們的濃度發生的不同變化以致放射性物質產生不同的稀釋度的關係, 所以我們計算了注射 S^{35} -甲硫氨酸後每 100 毫升血漿中它們的最大總放射性。受血吸蟲感染的動物每 100 毫升血漿中清蛋白的最大總放射性為 23.52。而正常動物為 55.26, 前

者較後者約小 $\frac{1}{2}$ ，病兔球蛋白的最大總放射性為 133.56，正常家兔為 84.53，前者反而較後者大得多。因此可認為家兔感染血吸蟲達到晚期時，從血漿清蛋白與球蛋白的合成總速度來看，血漿都減慢，主要是清蛋白的合成受到障礙，而球蛋白的合成可能因機體的代償性機制，終於反而較正常家兔為大。M. И. Асвят. 等人的工作中指出，用外科手術損傷鼠肝後， S^{35} -甲硫氨酸不能參入到血漿清蛋白中。由此類推，血吸蟲病患者在晚期出現低清蛋白血症，可能是由於肝臟合成血漿清蛋白能力減弱所致。

我們在探討甲硫氨酸的吸收情況實驗中，發現家兔在口服了 S^{35} -甲硫氨酸後，24 小時內糞中放射性物質的量僅佔其服入總放射物質的 0.17% (正常兔) 與 0.29% (病兔) (表 4)。因此可見感染血吸蟲的家兔，雖也有腹瀉症狀，但是對甲硫氨酸的吸收能力基本上與正常家兔無異，均能將 99.7% 的氨基酸吸入體內。因而我們認為在患晚期血吸蟲病時，蛋白質的吸收作用沒有變化。至於蛋白質的消化率是否發生變化，則未作測定。

關於感染血吸蟲後，因腹水生成可能損失體內蛋白質的問題，在用家兔所做的實驗中也不能直接測定。這是因為家兔雖受到嚴重的感染，其腹水量極少。但是如此正可以排除血吸蟲患者因腹水的形成而造成血漿蛋白過低的可能性。

腹水癌粒綫體有氧情況下 對酵解的抑制作用

李文裕 錢若蘭 胡兆慶

(中國科學院實驗生物研究所腫瘤研究室, 上海)

近年來, Aisenbery, Recker, Tiedemann 等用差速離心方法分離的細胞粒綫體和上清液, 研究呼吸與酵解的相互調節作用。對於腫瘤粒綫體多數的工作觀察到促進酵解的作用, 甚少極導對酵解的抑制。Graffi 等曾觀察到在缺氧狀態下, 一定量的腫瘤粒綫體抑制酵解, 但這與完整癌細胞的有氧抑制的機制可能是不同的。

我們以艾氏腹水癌為材料, 用含 $KHCO_3$ 的 0.25 M 蔗糖溶液做成勻漿, 在冷凍高速離心機 $1300 \times g$ 離心 3 分鐘除去細胞核, 再用 $10,000 \times g$ 離心 10 分鐘, 分離粒綫體和上層液 (包含微粒體)。將粒綫體部分表面的絨毛層除去後, 再用大量的 0.25 M 蔗糖溶液洗滌一次。上層液即用作為酵解酶系統。當粒綫體在有氧情況下, 用以下的溫育系統與上層液溫育於 $30^\circ C$, 20 分鐘, 對酵解表現抑制作用, 但不抑制葡萄糖的利用 (見表 1)。

表 1 腹水癌粒綫體對酵解的抑制作用

| | 葡萄糖利用 μM | 乳酸生成 μM | Pi 剩餘 μM |
|---------|------------------|-----------------|------------------|
| 上清液 | 3.59 | 5.15 | 4.60 |
| 上清液加粒綫體 | 4.37 | 3.04 | 0.83 |

溫育系統：葡萄糖 $11 \times 10^{-3} M$ ； $KHCO_3$ $12.5 \times 10^{-3} M$ ； $MgCl_2$ $3 \times 10^{-3} M$ ；ATP $5 \times 10^{-4} M$ ；DPN $5 \times 10^{-4} M$ ；無機 P $3 \times 10^{-3} M$ ；總體積為 2.2 ml。氣相 5% CO_2 /95% 空氣。

用 Kornberg, Slater, 酶方法測定被粒綫體抑制的酵解中間代謝產物, 6-磷酸葡萄糖 (G6P) 有明顯的積聚; 1,6, 二磷酸果糖 (FDP) 量很低, 沒有恆定顯著的差別。以果糖代替葡萄糖為底物, 粒綫體的抑制仍然存在。用 Roe 化學方法測定磷酸果糖量亦表示顯明的積聚 (見表 2)。用 G6P, F6P (6-磷酸果糖) 為酵解底物, 抑制仍然存在; 改用 FDP 為底物, 抑制作用消失。以上這些實驗結果明顯指出: 磷酸己糖激酶是粒綫體抑制酵解的重要作用點。少量的乳酸, 經測定約為 $0.3 \mu M$ 雖為粒綫體氧化, 但不能用此來解釋全部乳酸產量的減少。

表 2 粒綫體抑制酵解時中間產物的含量 μM /每呼吸瓶

| 底物 | 葡 萄 糖 | | 果 糖 | |
|--------|-------|---------|------|---------|
| | 上清液 | 上清液加粒綫體 | 上清液 | 上清液加粒綫體 |
| 乳酸產量 | 5.98 | 5.05 | 6.86 | 5.24 |
| Pi 剩餘 | 3.96 | 0.74 | 3.98 | 0.65 |
| G6P | 0.24 | 0.63 | 0.26 | 0.63 |
| FDP* | 0.02 | 0.09 | 0.06 | 0.20 |
| 磷酸果糖** | 0.37 | 0.68 | 0.43 | 0.99 |

* FDP 量用 Slater 酶法測定包含磷酸三糖量。

** 磷酸果糖包含 FDP 和 F6P。

粒綫體抑制磷酸己糖激酶機制的初步研究表明: 激酶活力的降低並非由於上層液中三磷酸腺苷的缺少; 圖 1 (略) 表示在溫育過程中抑制作用與不含粒綫體之上層液中腺嘌呤核苷酸含量的關係。因此, 激酶的活力可能是直接受到粒綫體抑制的。粒綫體抑制酵解的作用為二硝基酚, 氰化物, 缺氧及預溫粒綫體 1 小時所解除。這表明抑制作用與粒綫體的氧化磷酸化是密切相關的。粒綫體通過氧化磷酸化降低溫育液中無機磷濃度可能是產生抑制作用的重要條件 (見表 1-2)。在溫育液中增高無機磷使 G6P 含量趨向下降而增高 FDP 的含量 (見表 3)。添加適量的三磷酸腺苷酶, 亦得到同樣的結果。綜合以上觀察, 我們認為粒綫體抑制磷酸己糖激酶可能是通過氧化磷酸化降低無機磷濃度, 在這條件下, 粒綫體通過某種方式直接抑制激酶。

表 3 無機磷濃度對粒綫體抑制作用的影響

| 酵解代謝物質 | $3 \mu M$ Pi/ml μM | $7.6 \mu M$ /ml μM |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| 葡萄糖剩餘 | 17.16 | 14.17 |
| 乳酸產量 | 5.19 | 8.82 |
| 無機磷剩餘 | 0.83 | 2.94 |
| 7' 酸不穩定磷 | 4.32 | 6.62 |
| G6P | 0.51 | 0.48 |
| FDP | 0.16 | 0.59 |

這種抑制機制, 當參考完整服水痛細胞的實驗資料時, 顯然對酵解的調節起着重要的作用。

關係腫瘤“惡性磷脂”的探討

胡兆慶 李文裕

(中國科學院實驗生物研究所腫瘤研究室, 上海)

尋求腫瘤生化的特質, 對控制腫瘤具有重要的意義。日本神前武和等報導在腫瘤組織中發現由胆鹼、精胺、脂肪酸和磷酸組成的所謂“惡性磷脂”。應用於腫瘤患者的血液診斷獲得很滿意的結果。因此, 引起了相當廣泛的注意。但後來, 別的工作者重複試驗, 對比結果則表示懷疑, 爲了澄清這一問題, 我們在肝癌患者亦重複了血液診斷, 並且按神前氏的方法, 反覆地從大量艾氏腹水癌細胞提出所謂“惡性磷脂”對其性質進行了分析。

所用方法及試劑均嚴格按神前氏的規定。“惡性磷脂”的存在是以 Whatman 1 號濾紙, 用溶劑(吡啶:二甲醇縮甲醛:水=3.5:3:3.5), 在 25°C 層析展開得茚三酮兩顯色點(R_f 值各爲 0.38 和 0.51) 來確定。

表中分析了肝癌, 肝硬化患者和正常人血液中的“惡性磷脂”。結果表明, 此種物質並非專一地存在腫瘤患者的血液中。非腫瘤的陽性率亦很高。

附表 肝癌、肝硬化患者與正常人血液“惡性磷脂”的檢定

| | 檢定例數 | 陽性例數 | 陽性率 |
|--------|------|------|-----|
| 肝 癌* | 15 | 15 | 100 |
| 肝 硬 化* | 17 | 11 | 65 |
| 正 常 人 | 27 | 5 | 19 |

* 肝癌、肝硬化均經臨床診斷確定。

從艾氏腹水癌細胞抽提出來的“惡性磷脂”, 在 Whatman 濾紙上層析出的兩點, 不爲乙醚或丙酮洗脫, 但經水浸處理後則消失, 表明抽提的物質並非磷脂類。

“惡性磷脂”的紙層析行爲極類似幾種氨基酸。用吡啶-二甲醇縮甲醛-水溶劑, “惡性磷脂”的兩點與丙氨酸和甘氨酸或谷氨酸的 R_f 值相同。用吲哚醌 (Isatin) 顯色, 上面一點呈藍綠色與丙氨酸相同, 而下面一點呈紫色與甘氨酸或谷氨酸相同。改用酚:水 (8:2) 爲溶劑, “惡性磷脂”分離開三點, R_f 值與丙氨酸, 甘氨酸, 谷氨酸相同。在溶劑的前沿用銅酸銨顯色, 有一與卵磷脂位置相同的點。將“惡性磷脂”經 6 N HCl 水解 18 小時, 進行雙向層析, 溶劑第一向爲酚-水 (8:2), 第二向爲吡啶-水 (8:2), 分出四點, 其位置確定爲谷氨酸, 丙氨酸, 甘氨酸和少量的谷氨酰胺。從以上的紙層析分析, 抽提的“惡性磷脂”似乎僅是卵磷脂與氨基酸的複合物。用卵磷脂和谷氨酸, 甘氨酸, 丙氨酸爲樣品進行人工模擬實驗, 經同樣方法抽提後, 走層析, 獲得與“惡性磷脂”相同的茚三酮顯色點。

在以上多次對“惡性磷脂”的紙層析分析中, 沒有發現其他新的未知顯色點。

綜合以上血液診斷以及脂水癌抽提的“惡性磷脂”的分析結果, 表明神前氏所用的抽提方法是易於爲氨基酸污染; 由於這些污染的氨基酸的紙層析行爲與“惡性磷脂”相似, 故

用紙層析來鑑定“惡性磷脂”的存在是不適宜的。本實驗對“惡性磷脂”的存在得到否定的結果。

艾氏腹水腫瘤細胞綫粒體能量 利用的局部化

杜錦珠 李 瀟 伍欽榮

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

Gabtree 效應是腫瘤醣代謝的特點之一, 有關它的機制的研究對於了解腫瘤及正常細胞的代謝調節是很有幫助的。關於 Crabtree 效應機制的假說很多, 近幾年來如 Chance, Racker, Lehninger 等假定能量 ATP 在綫粒體內的局部化來進行解釋是最引人注意。但是有關能量 ATP 的局部化至今尚缺乏直接的證據。

已知蛋白質生物合成主要在綫粒體以外進行, 綫粒體內氧化作用所提供的能量透過綫粒體膜到綫粒體外去才能被有效地利用於蛋白質生物合成。我們利用 C^{14} -標誌甘氨酸參入蛋白質作為艾氏腹水腫瘤能量利用局部化的指標。腫瘤細胞係經多次洗滌盡量除去內源底物, 反應在 pH 7.4, $37^{\circ}C$ 進行共 30 分鐘, 用 13% 三氯醋酸(最後濃度)停止反應, 沉澱經三氯醋酸洗滌數次後再經熱三氯醋酸 ($90^{\circ}C$, 15 分鐘) 及有機溶劑處理。

當腫瘤細胞加入琥珀酸, 可以引起呼吸顯著增加, 比內源呼吸增加 40%, 同時也觀察到 C^{14} -標誌甘氨酸參入蛋白質增加壹倍以上, 說明腫瘤細胞的呼吸系統所提供的能量能有效地被利用於蛋白質生物合成, 由於蛋白質生物合成主要在綫粒體外進行, 因此, 同時也說明綫粒體內能量 ATP 可以透過綫粒體膜被有效地利用於蛋白質生物合成, 我們認為在這種條件下, 綫粒體內能量觀察不到明顯的局部化。當 2-脫氧葡萄糖和琥珀酸同時加入即在產生 Crabtree 效應的條件下, 呼吸比單獨加入琥珀酸時僅降低約 12%, 但 C^{14} -標誌甘氨酸參入量却減少約 60%。說明由琥珀酸氧化所提供的能量不能被有效地利用, 這種現象同時也說明在這種條件下即引起綫粒體內能量 ATP 的局部化。葡萄糖能引起和 2-脫氧葡萄糖相似的作用。

表 1

| 底 物 | 氧 吸 收 (每 20 分鐘微升數) | 脈 衝 數 (每毫克蛋白質每分鐘計數) |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| 對照 | 80 | 522 |
| 葡萄糖 | 65 | 806 |
| 琥珀酸 | 119 | 1182 |
| 2-脫氧葡萄糖+琥珀酸 | 104 | 522 |
| 2-脫氧葡萄糖+葡萄糖 | 66 | 664 |
| 2-脫氧葡萄糖 | 69 | 426 |
| 葡萄糖+琥珀酸 | 88 | 854 |

表 2

| 底 物 | 葡萄糖利用量 毫克 | 乳酸生成量 毫克 |
|-------------|--------------|-------------|
| 對照 | — | 0.25 |
| 葡萄糖 | 4.30 | 2.12 |
| 葡萄糖+琥珀酸 | 4.20 | 2.10 |
| 葡萄糖+2-脫氧葡萄糖 | 4.10 | 2.09 |

氧化磷酸化作用解偶聯劑 2,4-二硝基苯酚 對綫粒體中琥珀酸氧化的激活和抑制

林其誰 伍欽榮

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

Azzone 等發現綫粒體經磷酸鈉或 AMP-DNP 處理以後加入 ATP 可使琥珀酸的氧化加速。他們認為琥珀酸的氧化需要高能磷酸化合物加以促進。Slater 等和 Chance 等則認為 DNP 對琥珀酸氧化的影響和草酰乙酸的積聚有關。

我們利用自動記錄振動白金微氧電極研究 DNP 對琥珀酸氧化的影響。大白鼠肝臟綫粒體在加入 DNP ($2 \times 10^{-5} M$) 後琥珀酸的氧化明顯被激活, 約 1—2 分鐘後即逐漸受抑制。在加入 DNP 以前或在加入 DNP 以後呼吸仍處於激活階段時加入無機磷酸都可以使激活延長; 但若在 DNP 加入呼吸已被抑制以後方加入無機磷酸則不能使呼吸重行恢復。說明促進琥珀酸氧化的因素不是無機磷酸鹽本身, 而可能是在氧化磷酸化作用過程中產生的含磷化合物。ATP 在較低濃度時對 DNP 加入後琥珀酸氧化的抑制沒有影響, 但在較高濃度 ($7 \times 10^{-4} M$) 時, 可以使受 DNP 抑制的呼吸緩慢恢復。

DNP 對氧化的激活程度和 DNP 加入前琥珀酸與綫粒體一同保溫的時間長短有關。若同時加入琥珀酸與 DNP, 或琥珀酸在 DNP 後加入, 則琥珀酸氧化開始時即受抑制, 激活階段不出現。在加入 DNP 以前加入 β -羥基丁酸、丙酮酸、檸檬酸、異檸檬酸、 α -酮戊二酸、谷氨酸、5-異戊巴比妥酸鈉 (Amytal), 可以解除 DNP 對琥珀酸氧化的抑制; 若在 DNP 對琥珀酸氧化產生抑制以後加入以上試劑, 也可以部分解除抑制作用。

根據以上結果我們認為 DNP 對琥珀酸氧化的抑制作用似乎不能用草酰乙酸的堆積完滿地加以解釋。 α -酮戊二酸等底物能使被抑制的琥珀酸的氧化重行恢復的事實也是和這種解釋不符。我們認為在琥珀酸氧化的過程中, 氧化磷酸化作用所提供的能量部分通過反饋又促進了氧化本身。DNP 由於破壞了氧化和磷酸化作用之間的偶聯, 因此也擾亂了這種能量反饋作用, 而使琥珀酸的氧化無法維持。

DNP 對琥珀酸氧化的抑制受 α -酮戊二酸等多種試劑解除的機制可能不盡相同, 但值得注意的是它們都和輔脫氫酶的氧化還原有關。利用雙光路自動記錄差吸收光譜儀的

研究，發現在 DNP 使綫粒體內源的還原輔酶完全氧化以後，加入 α -酮戊二酸可以使內源輔酶逐漸部分還原。內源輔酶的氧化還原可能間接影響琥珀酸的氧化。

DNP 對琥珀酸這種激活和抑制效應有賴於綫粒體的完整，它可能和綫粒體代謝的某些調節機制有關。綫粒體經超聲處理 90 秒以後 DNP 對琥珀酸的激活和抑制效應即完全消失，而電子顯微鏡觀察說明綫粒體僅少部分破裂，外形和未經超聲處理的綫粒體差別不大。

肝綫粒體琥珀酸氧化機制的研究

敖世洲 張友端

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

自從發現琥珀酸引起綫粒體內源 DPN* 還原為一需能反應以後，Azzone 和 Ernster 根據砷酸鹽和雙香豆素處理綫粒體，引起琥珀酸氧化抑制，並能為 ATP 所激活的現象，認為琥珀酸氧化需要能量激活。另一些作者指出引起琥珀酸氧化抑制的種種措施都使草酰乙酸堆積，它是琥珀酸氧化的抑制劑，ATP 可以通過各種途徑將其除去。琥珀酸氧化機制尚未獲得闡明，其解決對於呼吸鏈反傳和磷酸化過程的研究十分重要。

我們用等滲蔗糖溶液分離大鼠肝綫粒體。用振動白金電極測定氧吸收**。觀察了 DNP 和砷酸鹽對琥珀酸氧化的激活作用，並對影響琥珀酸氧化的各種因素進行了分析。現將主要結果敘述如下：

DNP 對琥珀酸氧化的激活作用，隨濃度不同而異。低濃度 (5×10^{-3} mM, 10^{-2} mM) DNP 引起較低的氧吸收率，而不出現抑制現象；高濃度 (3×10^{-2} mM 以上) DNP 只有短時間的氧化激活隨即引起抑制。並且隨濃度升高，激活程度愈小，抑制出現愈早。DNP 引起的琥珀酸氧化抑制本質，Slater 等認為是草酰乙酸堆積的結果。因而需要分析一下 DNP 對草酰乙酸的形成和氧化的影響情況。草酰乙酸是琥珀酸和蘋果酸的氧化產物，其形成的量應當與氧消耗量相一致。低濃度 DNP 會不會不解聯 DPNH 和細胞色素 b 之間的磷酸化作用，只有蘋果酸的堆積，而不產生草酰乙酸呢？需 DPN 的底料和琥珀酸被 DNP 的作用是一致的，低濃度 DNP 既能激活琥珀酸氧化，也能使 DPNH 的氧化激活。不同濃度 DNP 對草酰乙酸氧化的影響不甚明顯，隨 DNP 濃度升高，其氧化稍有增加。因此，上述 DNP 對琥珀酸氧化的激活行為無法用草酰乙酸的堆積來說明。我們所獲得的實驗結果表明琥珀酸氧化的抑制是與 DNP 的濃度，也就是其對磷酸化解聯和對 ATP 的水解能力相關聯的。

如果反應液裏預先加入 2 mM 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉 (Amytal) 以上 DNP 引起的琥珀酸氧化抑制全部避免。此時 10^{-1} mM DNP 給出最大的氧吸收率。如果其在 DNP 已引起抑制之後加入，琥珀酸氧化仍有部分恢復，相當於預先加入的 $\frac{1}{2}$ 。5 乙 5 異戊巴比

* 本文簡稱如下：DPN 輔酶 I；DPNH 還原輔酶 I；ATP 三磷酸；DNP 2,4-二硝基苯酚。

** 振動白金電極測氧技術在伍欽榮先生幫助下裝成，工作中也得到很多幫助和啓發，謹此致謝。

妥酸鈉的作用，除了能阻止草酰乙酸的形成以外，尚有其他機制影響 DNP 對琥珀酸氧化的激活作用。

在不含無機磷和 ADP 的反應系統內，我們又觀察了 2—10 mM 砷酸鹽對琥珀酸氧化的激活作用。4 mM 砷酸鹽給出最大的氧吸收率，濃度升高，氧吸收率也不再改變。與 DNP 作用相反，砷酸鹽單獨作用，看不出琥珀酸氧化的抑制。在有 2 mM 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉存在時，砷酸鹽激活琥珀酸氧化的第三分鐘氧吸收率開始下降，而逐漸趨於抑制。此時蘋果酸氧化完全被抑制，草酰乙酸不會有堆積，這就為研究琥珀酸氧化是否需要能量，提供了有利條件。

比較 DNP 單獨作用和 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉-砷酸鹽共同作用引起的琥珀酸氧化抑制程度差別，前者大於後者。它們受 ATP 的影響情況也有區別：1 mM ATP 能消除 10^{-1} mM DNP 引起的琥珀酸氧化的抑制，氧吸收率相當於最大氧吸收率的 $2/3$ 。增加 ATP 的濃度，氧吸收率也不再改變。1 mM ATP 對 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉-砷酸鹽引起的琥珀酸氧化抑制也具有解除作用，並使氧吸收率略高於砷酸鹽單獨作用所給出的氧吸收率。這些都反映在 DNP 的單獨作用下，草酰乙酸仍可能有堆積，它在抑制琥珀酸的氧化中仍發揮了一定作用。

5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉的作用是抑制 DPNH 的氧化，以上結果又指出它對 DNP 和砷酸鹽激活琥珀酸氧化的作用完全相反。因此需要分析一下其對腺三磷酶的影響，以了解它是否干擾磷酸化的中間過程。2 mM 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉對 10^{-1} mM DNP 和 4 mM 砷酸鹽激活的腺三磷酶作用均無影響。因此，5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉的不同作用，僅能由 DPNH 的氧化被抑制來說明。在正常情況下，呼吸鏈磷酸化作用全都進行，加入 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉，抑制了 DPNH 的氧化，一部分磷酸化作用也被截止。此時磷酸化過程中各種高能中間物的分佈關係就可能有所差異，這種高能中間物的分佈情況如果滿足了 DNP 激活琥珀酸氧化的能量要求，就給出了最大的氧吸收率。砷酸鹽對 DPNH 與細胞色素 b 之間的磷酸化作用較為特殊，它與 DNP 解聯作用點也不相同，滿足砷酸鹽激活琥珀酸氧化的能量要求，可能為 5 乙 5 異戊巴比妥酸鈉的作用所不能達到。至於砷酸鹽單獨作用不引起琥珀酸氧化抑制，可能是由於砷酸鹽又為底料水平的磷酸化作用解聯劑，在其單獨作用下，雖然琥珀酸氧化抑制了，其他內源的、需 DPN 的底料仍然繼續氧化，此時僅僅從氧化的測定上就不能觀察到琥珀酸氧化的抑制。

由實驗結果所得到的種種分析，我們認為琥珀酸氧化需要能量激活。但是在一定條件下，由於有草酰乙酸堆積，它對琥珀酸氧化仍可能表現一定抑制作用。

(本工作進行及總結中，承鄒承魯先生提供寶貴意見，謹此致謝)。

谷氨酸醱酵菌—2990-6 號的代謝

一、葡萄糖的降解途徑

余微明 楊常仁 周光宇

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

周光宇等曾研究了谷氨酸醱酵菌——2990-6 號的谷氨酸醱酵條件和影響谷氨酸堆積的各種因素, 以下就這一菌株的葡萄糖降解途徑作一些探討。

2990-6 號菌的休止細胞可以氧化葡萄糖, 對於葡萄糖-6-磷酸和丙酮酸等中間代謝物的氧化都要慢得多。

以溶菌酶或超聲波處理可以做成無細胞制劑, 這種制劑可以氧化葡萄糖-6-磷酸等, 在以葡萄糖-6-磷酸為底物氧化時輔酶 II 是必要的輔助因子, 碘乙酸有強烈的抑制作用。

測定 2990-6 號菌的無細胞制劑中有磷酸己糖異構酶、磷酸果糖、磷酸激酶、醛縮酶、3-磷酸甘油醛脫氫酶、磷酸甘油酸變位酶、烯醇化酶和丙酮酸激酶, 亦即有從葡萄糖-6-磷酸到丙酮酸糖酵解途徑的酶系。(己糖激酶另有報導)。

2990-6 號菌的無細胞制劑還有對輔酶 II 專一的葡萄糖-6-磷酸脫氫酶和 6-磷酸葡萄糖酸脫氫酶, 6-磷酸葡萄糖酸脫氫酶的作用產物有二氧化碳和戊糖, 以核糖-5-磷酸作為底物可以得到戊酮糖, 同時還有庚糖、己糖和 3-磷酸甘油醛, 表明無細胞制劑有戊糖磷酸異構酶、轉酮酶和轉醛酶, 這樣看來己糖支路的糖降解途徑也是具備的。

糖酵解和己糖支路的二個糖降解途徑是以葡萄糖-6-磷酸作為分支點的, 葡萄糖-6-磷酸的去路在很大程度上決定於磷酸己糖異構酶和葡萄糖-6-磷酸脫氫酶的相對活力, 實驗證明這二個酶的相對活力與獲得培養物的培養基有關係, 能够堆積大量谷氨酸的培養基中所獲得的培養物, 它的葡萄糖-6-磷酸脫氫酶和磷酸己糖異構酶的活力的比例較之在不能堆積谷氨酸的培養基中所獲得的培養物的酶活力比例要高得多(附表), 因此認為代謝途徑比例的改變與谷氨酸的堆積有關。

附表* 從二種培養基獲得菌體的葡萄糖-6-磷酸脫氫酶、6-磷酸葡萄糖酸脫氫酶與磷酸己糖異構酶的活力比較

| | 谷氨酸量 克/100 毫升培養基 | I 葡萄糖-6-磷酸 脫氫酶 | II 6-磷酸葡萄糖酸 脫氫酶 | III 磷酸己糖異構酶 | I/III | II/III |
|-------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------|-------|--------|
| 種子培養基 | 0 | 0.22 | 0.047 | 0.23 | 0.96 | 0.20 |
| 醱酵培養基 | 1.02 | 0.77 | -0.164 | 0.12 | 6.41 | 1.37 |

* 表中所指脫氫酶活力係在相同測定條件下每毫克蛋白質使分光光度計 340 m μ 波長處光密度改變的數值, 異構酶的活力係在相同測定條件下每毫克蛋白質生成果糖的毫克數。

參 考 文 獻

[1] 周光宇, 龔業業, 余微明, 陳志民: 生物化學與生物物理學報 1 卷 2 期, 1961 年。

谷氨酸醱酵菌—2990-6 號的代謝

二、三羧循環

龔綦綦 周光宇

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

利用瓦氏測氧法以及 2,6-二氯酚靛酚染料脫色法證明 2990-6 號菌的休止細胞能氧化與三羧循環有關的中間物: 丙酮酸、草酰乙酸、蘋果酸、延胡索酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸和谷氨酸。但是檸檬酸、順烏頭酸以及異檸檬酸由於細胞滲透性的原故不為休止細胞所利用。

利用分光光度法、染料脫色法以及紙層析方法在超聲波和溶菌酶的無細胞制劑中測出輔酶 II 專一的異檸檬酸脫氫酶、谷氨酸脫氫酶、需要輔酶 I 或輔酶 II 的蘋果酸脫氫酶, 並有順烏頭酸酶、檸檬酸脫氫酶、延胡索酸酶、丙酮酸氧化酶以及谷門轉氨酶和谷丙轉氨酶。

無細胞制劑中尚未測出 α -酮戊二酸的氧化酶系, 但從休止細胞能利用 α -酮戊二酸的事實來看此酶系亦應存在。因此從上述結果證明 2990-6 號菌具備三羧循環的完整體系。

用延胡索酸的銨鹽為底物與休止細胞保溫(醱酵培養基的菌體)結果產物為天門冬氨酸, 證明有天門冬氨酸酶的存在。

延胡索酸的銨鹽加醋酸銨保溫結果產物為谷氨酸。

檸檬酸、順烏頭酸和異檸檬酸加輔酶 II (無細胞制劑) 保溫的產物在有銨鹽存在時為谷氨酸, 無銨鹽時為 α -酮戊二酸。

從以上保溫結果得知谷氨酸能通過三羧循環形成, 休止細胞或酶制劑在保溫條件下能積累谷氨酸或 α -酮戊二酸。在醱酵的情況下有銨鹽存在時產物為谷氨酸, 無銨鹽時為 α -酮戊二酸, 結果和保溫實驗一致。

由此看出 2990-6 號菌一方面表現能完全氧化谷氨酸(一般測定結果為 3—4.3 微克分子氧/1 微克分子谷氨酸), 另一方面又能醱酵葡萄糖或利用其他底物累積 α -酮戊二酸或谷氨酸, 將醱酵培養基培養二日的菌體以葡萄糖、谷氨酸和 α -酮戊二酸作為底物測定氧吸收的結果如下表, 可以看出葡萄糖的氧化速度比谷氨酸約大十倍。

| | |
|----------------|---------------------------------|
| 葡萄糖 | 289 $\mu\text{l O}_2$ /小時/毫克菌體氮 |
| 谷氨酸 | 30 $\mu\text{l O}_2$ /小時/毫克菌體氮 |
| α -酮戊二酸 | 6 $\mu\text{l O}_2$ /小時/毫克菌體氮 |

註: 係以飽和底物濃度氧化最快時的數據計算。

從以上結果初步看出, 2990-6 號菌雖有完整的三羧循環酶系, 能氧化 α -酮戊二酸和谷氨酸, 但是由於氧化能力很低, 因此有利於醱酵液中大量堆積 α -酮戊二酸和谷氨酸。

谷氨酸醱酵菌—2990-6 號的代謝

三、天門冬氨酸酶與谷氨酸醱酵

陳立羣 周光宇

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

龔業素等的報導指出：在醱酵培養基中培養的 2990-6 號菌具有谷氨酸脫氫酶、天門冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸轉氨酶和天門冬氨酸谷氨酸轉氨酶的活性，我們的工作證明：該菌無丙氨酸脫氫酶的活性，Kinoshita 報導 *Micrococcus glutamicus* 的氮同化作用是以谷氨酸脫氫酶為主的，這株菌和 Shio 等報導的短桿菌都有天門冬氨酸酶的活力，但他們沒有進一步肯定該酶在谷氨酸醱酵中的作用。

我們發現：2990-6 號菌在種子培養基中培養的菌體沒有天門冬氨酸酶的活力，只是在進入醱酵培養基後始產生此酶，而谷氨酸脫氫酶在兩種培養基中培養的菌體內都能測出，由於兩種培養基成分的主要差別是在於前者含有蛋白胨和較低量的銨鹽，後者不含蛋白胨及含有較高量的銨鹽。因此，我們研究了在不同培養條件下蛋白胨、銨鹽等對天門冬氨酸酶活力及谷氨酸堆積量變化的影響，結果指出：(1) 在醱酵過程中隨着醱酵液中谷氨酸的堆積菌體內即出現天門冬氨酸酶的活性；(2) 在含有不同量銨鹽的醱酵液中谷氨酸堆積量與菌體內天門冬氨酸酶比活力有平行關係；(3) 將種子培養基中收穫的菌體大量懸浮在醱酵培養基中 10 小時後菌體內即出現天門冬氨酸酶活性，同時醱酵液中即有少量谷氨酸堆積；(4) 當這株菌生長在 1.0% 蛋白胨為唯一氮碳源的培養基中時菌體內缺乏天門冬氨酸酶的活性，同時亦不堆積谷氨酸；(5) 在醱酵培養基中加入微量生物素 (0.1 γ /100 ml) 可使谷氨酸堆積完全抑制，同時菌體內亦無天門冬氨酸酶活性。

在以上各項實驗中谷氨酸脫氫酶的比活力隨着谷氨酸的堆積雖也有所增加，但其量 (MNH₃/毫克蛋白/小時) 一般只有天門冬氨酸酶比活力的 1/10 左右，如果離體酶測定符合整體內酶活力的情況，則菌體中天門冬氨酸酶比谷氨酸脫氫酶活力約大 10 倍。

根據以上的結果指出的谷氨酸堆積與天門冬氨酸酶活性增長有着密切的關係看來，2990-6 號菌在醱酵條件下其天門冬氨酸酶對谷氨酸的形成是起着主要作用的。

谷氨酸醱酵菌—2990-6 號的代謝

四、還原型菸酰氮核苷酸的氧化

曾以申 周光宇

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

在良好的通氣情況下, 2990-6 號菌利用葡萄糖醱酵產生谷氨酸其理論轉化率在 50% 左右, 谷氨酸的碳架是 α -酮戊二酸。從 α -酮戊二酸生成谷氨酸的過程可以是: (1) 由谷氨酸脫氫酶的作用, 經還原性的氯化或 (2) 經轉氨過程。但是無論經過那一條路產生谷氨酸都總是個直接或間接消耗還原輔酶的過程, 而是否由於還原輔酶的氧化受阻或由於氧化型輔酶的缺乏而急需周轉等等原因, 以致細菌大量累積谷氨酸。這就是我們想探索的問題。

爲了研究還原輔酶的氧化, 我們得先了解 2990-6 號菌的呼吸鏈組成。用分光光度法觀察到它具有和動物組織在光譜上相似的細胞色素 a, b, c 三組, 菸酰胺核苷酸, 黃蛋白和能與 CO 結合的呼吸酶, 此呼吸酶的差異光譜不同於 a_1, a_2, a_3, a_4 和 0。

依照 B. Chauce (Adv Enzymol 17, 65, 1956) 的計算方法, 從差異光譜得知生長菌 (從種子培養基內收穫的菌體, 此時菌體雖繁殖旺盛, 但不堆積谷氨酸) 和醱酵菌 (從醱酵培養基內收穫的菌體, 此時菌體雖繁殖的很少, 但堆積大量的谷氨酸) 在呼吸鏈的組成上沒有性質上的差別, 但在量方面, 生長菌略低於醱酵菌, 但是吸收峯在 $440 m\mu$ 的那個色素則反之, 此色素可能就是與 CO 結合的呼吸酶。

用 DPNH 爲底物證明 2990-6 號菌的無細胞制劑或從它分離而出的碎片 (原生質膜碎片?) 具有很強的 DPNH 氧化酶, 此酶系是受氯丙嗪, BAL, KCN 和 CO 的強抑制, 後者的抑制能被光解除, 初步認爲它是經過呼吸鏈氧化的。

用 TPNH 爲底物得知 2990-6 號菌的無細胞制劑或從它分離出的“可溶部分”具有 TPNH 氧化酶, 此氧化過程不受 BAL, KCN 的抑制但受奎寧的抑制, 而且是氧分壓敏感的透析後的活力爲對照的 60—70%, 初步認爲它可以不通過呼吸鏈而氧化。

我們比較了生長菌和醱酵菌二者的無細胞制劑中某些酶的比活力和菸酰胺核苷酸的含量。結果如下: 比活力單位: $\Delta O. D. 340 m\mu$ /毫克蛋白/分鐘。溫度 $25^\circ C$ 。

表 1 生長菌和醱酵菌幾種酶活力的比較

| 酶 名 稱 | I 生長菌 | II 醱酵菌 | I/II | 註 |
|------------------|--------|--------|------|-------------------|
| DPNH 氧化酶系 | 0.570 | 0.116 | 4.9 | |
| TPNH 氧化酶 | 0.0342 | 0.0248 | 1.4 | |
| 轉氨酶 | 0.0254 | 0.0058 | 4.4 | |
| 谷氨酸脫氫酶 | 0.0180 | 0.0400 | 0.45 | TPN 專一的 |
| 葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 | 0.155 | 0.240 | 0.64 | TPN 專一的 |
| DPNH 遞酶 (甲烯藍爲受體) | 1.08 | 0.585 | 1.9 | 反應溫度 $10^\circ C$ |

利用螢光法測定了生長菌和醱酵菌內部的菸酰胺核苷酸含量結果如下：
單位：微克分子/克蛋白。

表2 菸酰胺核苷酸的含量

| 菌體 | TPNH | DPNH |
|-----|---------|---------|
| | TPN | DPN |
| 生長菌 | 5.3±1.4 | 15±0 |
| 醱酵菌 | 1.3±0.3 | 5.6±1.2 |

由於 DPNH 氧化酶系和 TPNH 氧化酶在細胞內的分佈不同因此我們測定了幾種與 DPN 或 TPN 聯系的酶的分佈結果如下：(在本實驗條件下得正結果的用“+”表示，反之用“-”)。

表3 數種和菸酰胺核苷酸有關的酶的分佈

| 輔酶專一性 酶名稱 | 分佈 | 碎片部分 | | 可溶部分 | |
|--------------|----|------|-----|------|-----|
| | | TPN | DPN | TPN | DPN |
| G-6-P 脫氫酶 | | - | - | + | - |
| 異檸檬酸脫氫酶 | | - | - | + | - |
| 谷氨酸脫氫酶 | | - | ? | + | ? |
| 蘋果酸脫氫酶 | | - | + | + | + |
| DPNH 氧化酶 | | / | + | / | - |
| TPNH 氧化酶 | | - | / | + | / |
| DPNH 還酶 | | / | + | / | ? |
| TPNH 還酶 | | - | / | + | / |
| 轉氫酶 | | - | | + | |

從表3得知在我們已測定過的這幾種與 TPN 聯系的酶都分佈在“可溶部分”而不分佈在碎片上，僅有與 DPN 聯系的酶才分佈在碎片上，這可能與二種輔酶生化功能上的分工有關。

以上結果表明：生長菌對還原輔酶的氧化能力和輔酶的含量方面都顯著地大於醱酵菌，這些差異可能有利於谷氨酸的形成，而造成這些差異的原因正在進一步探索中。

2990-6 號菌的己糖激酶

楊建中 周光宇

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

余微明等的報導中已經指出 2990-6 號菌具備從葡萄糖-6-磷酸到丙酮酸的糖酵解和己糖支路的酶系，但儘管休止細胞能很快地氧化葡萄糖而無細胞制劑却不能利用葡萄糖。

我們的工作指出如果在制備無細胞制劑前用底物(葡萄糖)進行保護,則酶制劑即能顯示葡萄糖氧化能力。並且證明丙酮乾粉無需底物的保護能長期保持酶活。只有在進行抽提時必須加入葡萄糖溶液,抽提液置於冰箱酶活僅能保持數日。抽提的最適條件為:10°C 以下, pH 7.2—7.6, 時間約三小時。葡萄糖保護的濃度為5毫克/毫升時酶的活力已達到最高。

利用瓦氏呼吸器測氧吸收, 意酮法測定葡萄糖的減少, 證明: 離心, 透析後的葡萄糖保護的無細胞制劑氧化葡萄糖時, ATP、Mg⁺⁺、輔酶 I 或輔酶 II 均為必須加入的輔助因子。並於分光光度計上可以測出輔酶的還原。應用醋酸鈉緩衝液(pH 7.8)進行電泳, 結果證明, 僅加 ATP、Mg⁺⁺ 作用為輔助因子所得反應產物的電泳行為與葡萄糖-6-磷酸相同。利用磷酸酯酶作用則該產物生成葡萄糖。沒有測出6-磷酸葡萄糖酸或葡萄糖酸。

以上結果證明: 葡萄糖保護的無細胞制劑氧化葡萄糖過程中的第一個酶為己糖激酶。2990-6 號菌的己糖激酶分佈於 100,000×g 的上清部分, 作用的底物保護濃度為 1×10⁻¹ M, 高於 2×10⁻¹ M 即有抑制現象。作用最適 pH 為 7.3。

除葡萄糖能保護己糖激酶外半乳糖亦有明顯的保護作用, 木糖次之, 但半乳糖很少被利用。

無細胞酶制劑無需保護即能氧化果糖, 但無論保護與否均不能利用甘露糖。

氯仿中毒對大鼠肝臟酪氨酸 氧化酶系的影響

王 忠 炎

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

我們以前的工作證明四氯化碳中毒的大鼠肝臟內酪氨酸和對-羥苯丙酮酸氧化的強度顯著下降。如在反應系統中加入 2,6-二氯酚醌酚, 則上述物質被氧化的能力全部恢復至正常動物的酶活力水平。表明四氯化碳中毒情況下對-羥苯丙酮酸氧化酶系遭到破壞。

本文觀察氯仿中毒對鼠肝酪氨酸氧化酶系的影響。同時欲闡明維生素 B₁₂ 和甲硫氨酸在氯仿中毒過程中的作用。

成年大鼠(體重 140—160 克)放在氯仿蒸氣飽和的乾燥器內每日薰 3—5 分鐘。部分動物在氯仿處理前三小時, 每天分別注射維生素 B₁₂ (20 γ/150 克體重) 或甲硫氨酸 (1 mM/100 克體重)。共 20 天。對照動物經同樣處理, 但不充氯仿蒸氣。酶液由肝臟丙酮粉內抽提, 在磷酸緩衝液 (0.2 M pH 7.4) 內利用瓦氏測壓計量氧吸收 (37°C)。

氯仿中毒並不引起肝內酪氨酸氧化酶系的破壞, 酶活力保持正常對照動物的水平。預先注射 B₁₂ 的中毒動物肝臟酶制劑氧化酪氨酸的能力降低, 單獨注射 B₁₂ 亦導致同樣的結果。說明氯仿和四氯化碳引起肝臟損害是通過不同的途徑, 雖然它們兩者都造成肝

內脂肪的堆積。這與前人的觀察結果相符。長期注射 B_{12} 致使酪氨酸氧化酶系破壞的問題有待進一步闡明。

氯仿中毒動物注射酪氨酸後酪氨酸氧化酶系活力不誘導升高。長期注射 B_{12} 的大鼠在注射酪氨酸後酶活力顯著增加。說明後者保持酶的誘導合成的能力。

長期注射甲硫氨酸，肝臟酶制劑氧化酪氨酸的能力有微弱地升高。這種動物對底物的誘導沒有反應。

注射甲硫氨酸的中毒動物肝臟酶制劑對酪氨酸氧化的能力在多數實驗中表現降低，但氧化對-羥基丙酮酸的強度與單獨注射甲硫氨酸的動物相同，設想氯仿中毒引起上述動物肝內酪氨酸- α -酮戊二酸轉氨酸活力破壞。

組織學觀察結果表明，與氯仿中毒動物相同，注射維生素 B_{12} 或甲硫氨酸的中毒動物肝內都有脂肪的堆積。有趣地指出，單獨維生素 B_{12} 長期注射同樣造成肝內脂肪嚴重地堆積。

(組織切片承生理所鄭則慧同志幫助，特此致謝)。

可溶性核糖核酸的酶促降解

I. 大腸桿菌核糖核酸酶對大腸桿菌

可溶性核糖核酸的作用

劉望夷 王德寶

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

已知可溶性核糖核酸 (sRNA) 不能被多核苷酸磷酸化酶完全降解，某些核糖核酸酶水解 sRNA 與大分子核糖核酸 (HRNA) 的情形也有不同。關於大腸桿菌核糖核酸酶 (E. coli RNase) 對 sRNA 的作用，現有兩種不同意見，Dunn 等報告 E. coli RNase 可以水解 sRNA 而產生四種單核苷酸，但 Zillig 認為 E. coli RNase 作用於 sRNA 時，只能增加其酸溶性，而得不到單核苷酸或低級多核苷酸。我們為了澄清這個情況，因此對 E. coli RNase 作用於 E. coli sRNA 的情形作了一些觀察。

E. coli RNase 基本上按照 Spahr 和 Hollingworth 法制備，但用 EDTA 代替尿素以破壞核糖核蛋白體。酵母和大腸桿菌 HRNA 按照 Crestfield 等法制備；酵母和大腸桿菌 sRNA 根據 Monier 等法提取。

上述各種 RNA 和 E. coli RNase 制劑皆用 EDTA 透析處理，再用玻璃蒸餾水透析，以除去樣品中可能存在的金屬離子及其他小分子雜質。

I. Na^+ 和 Mg^{++} 對酶活力的影響：

Elson 以及 Spahr 和 Hollingworth 報告 Na^+ 可提高 E. coli RNase 的活力，其最適濃度為 0.3 M；而 Mg^{++} 對酶活力有抑制作用。我們發現， Na^+ 的最適濃度為

0.1 M; 而 Mg^{++} 在適當濃度下, 不但不抑制酶的作用, 反能提高其活力, 最適濃度為 0.025 M。但在低濃度 (0.0025 M) 與高濃度 (0.05 M) 下, 對 sRNA 的水解則表現特殊的抑制作用。

由於 Elson 以及 Spahr 和 Hollingworth 在制備酶的過程中沒有用 EDTA 處理, 他們觀察到的 Mg^{++} 抑制酶活力, 可能是酶制劑中含有過多的 Mg^{++} , 而不是 RNA 樣品中的 Mg^{++} 抑制了酶活力, 因為我們用不經 EDTA 處理的 RNA 作實驗, Mg^{++} 仍有提高酶活力的作用。

II. sRNA 與 HRNA 水解速度的比較:

E. coli RNase 降解酵母 HRNA, 酵母 sRNA, *E. coli* HRNA 和 *E. coli* sRNA 的速度不同。在 Mg^{++} 最適濃度下, sRNA 的水解速度遠比 HRNA 為慢。其順序如後:

酵母 HRNA > *E. coli* HRNA > 酵母 sRNA > *E. coli* sRNA。

在 Na^+ 最適濃度下; 其次序如下:

E. coli HRNA > 酵母 HRNA > *E. coli* sRNA > 酵母 sRNA。

此外, 我們還發現 sRNA 對 *E. coli* RNase 分解 HRNA 有抑制作用。

III. 提高 sRNA 水解速度的幾種嘗試:

為了探討 sRNA 水解速度較慢的原因, 作了以下幾個實驗:

(一) *E. coli* sRNA 的化學處理:

sRNA 具有二級結構, 這種二級結構可能影響酶的作用。把 sRNA 分別用下述方法處理: (1) HNO_2 脫氨 (按 Marini 法), (2) 在 SM 尿素溶液中加熱, 然後透析去除尿素, (3) 在 pH 9 保溫以除去 sRNA 末端連接的氨基酸, 使其分子構型改變。

用上述任何一種方法處理的 sRNA, 其水解速度與未經處理的 sRNA 基本相同。

(二) *E. coli* sRNA 的提純:

為了排除 sRNA 樣品中含有某種雜質抑制了酶活力的可能性, 用雙氫鏈霉素與 sRNA 形成不溶於水的複合物的方法進一步提純 sRNA。提純後的 sRNA 的水解速度與提純前沒有差別。

關於 sRNA 水解速度慢的原因, 正在繼續研究中。

IV. 酶解產物的鑑定:

(一) 用大量的酶水解 *E. coli* sRNA, 在 Mg^{++} 和 Na^+ 的最適濃度下, 都可以得到四種單核苷酸 (用紙電泳法分離鑑定)。

(二) 當用酶量很少, 在 HRNA 完全降解為酸溶性的核苷酸時, *E. coli* sRNA 僅有部分降解, 大部分仍可用酸沉澱下來, 其電泳行為與未經 RNase 處理的 sRNA 相似。但在酸溶性部分仍可以得到四種單核苷酸。本文報告的結果與 Dunn 等一致而與 Zillig 不同。

V. 其他 RNA 降解酶的檢查:

大腸桿菌除含有 RNase 外, 還含有多核苷酸磷酸化酶和磷酸二酯酶。為了證明 sRNA 被 *E. coli* 酶制劑水解成單核苷酸不是由於後兩種酶的作用, 因此對它們的活力進行了檢查。磷酸二酯酶在最適 pH (pH 9.2), Mg^{++} 存在下, 降解熱變性的脫氧核糖核酸 (DNA) 遠比 RNA 快, 但在上述條件下, *E. coli* RNase 制劑對熱變性的 DNA

不能降解，說明其中無磷酸二酯酶存在。

多核苷酸磷酸化酶降解 RNA 要求無機磷和 Mg^{++} 同時存在。在上述全部實驗中，沒有無機磷，因此，不可能有多核苷酸磷酸化酶的作用。此外，水解生成的四種單核苷酸皆為核苷一磷酸，而不是核苷二磷酸。產物的性質也排除了多核苷酸磷酸化酶作用的可能性。

肝癌病人尿液中特殊紫外光 吸收物質的研究

王昌材 孫 冊

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

肝癌病人尿的濃縮液，用異戊醇-氨-水的溶劑系統進行紙層析，發現有一個紫外光吸收點，它的吸收高峯在 $258 m\mu$ ，低峯在 $227-228 m\mu$ ， $295 m\mu$ 附近有一小吸收峯， $250 m\mu/260 m\mu$ 的光吸收值之比為 0.83， $280 m\mu/260 m\mu$ 為 0.38， $290 m\mu/260 m\mu$ 為 0.37。

收集肝癌病人尿液，用 HCl 調到 pH 2，通過 Zeo-Karb 225 陽離子交換樹脂柱，然後用水洗脫，將含有這個紫外光吸收物質的部分合併，並用 NH_4OH 調到 pH 9，通過 Zerolit FF 陰離子交換樹脂柱，用水洗脫，在分光光度計上測定洗脫液的光吸收，取紫外光吸收情形與這個物質相符的部分，減壓濃縮，再用國產新華 3 號濾紙在異戊醇-氨-水的溶劑中進行層析分離，剪下 R_f 在 0.3 附近的紫外光吸收帶，用水洗脫，洗脫液乾燥後得白色固體，在水中重結晶兩次，得白色斜方體結晶，熔點為 $209-210^\circ C$ ，元素分析結果： $C=55.26$ ， $H=6.34$ ， $N=17.66$ ，不含磷和硫，有一個 $N-CH_3$ 或 $N-C_2H_5$ 基，分子量測定為 160，推算出它的分子式應是 $C_7H_{10}O_2N_2$ ，從分子式計算 $C=54.53$ ， $H=6.54$ ， $N=18.17$ ，分子量 = 154.17 用二苯胺法或半胱氨酸紙上顯色法測定脫氧核糖，均呈陰性，苔黑酚核糖反應亦呈陰性。能溶於水及乙醇，幾乎不溶於四氯化碳及二硫化碳。

這個化合物在四種不同溶劑(正丁醇-甲酸，異戊醇-氨-水，正丁醇-氨，異丙醇-鹽酸-水)中的紙層析結果，都只得到一個紫外光吸收點；在異丙醇-鹽酸-水的溶劑中，它的紙層析行為與腺嘌呤、鳥嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶，以及前四種碱基的核苷化合物均不一樣。在 pH 3.0 及 pH 9.0 緩沖液中紙電泳的結果，均向負極移動，在 pH 3.0 緩沖液中的泳動速度與尿嘧啶和胸腺嘧啶相接近，而在 pH 9.0 時的泳動方向與尿嘧啶和胸腺嘧啶相反。

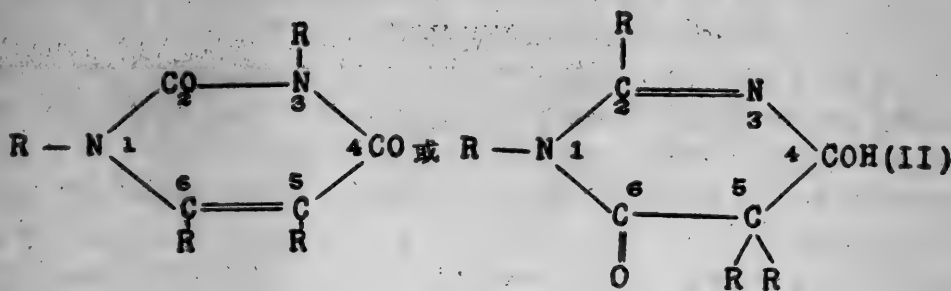
它的紫外光吸收圖譜，自 pH 2 至 pH 12 均相同，最大吸收在 $258 m\mu$ ，最小吸收在 $227 m\mu$ ，在 $295 m\mu$ 處有一小吸收峯； $250 m\mu/260 m\mu$ 的光吸收值之比為 0.82， $280 m\mu/260 m\mu$ 為 0.36， $290 m\mu/260 m\mu$ 為 0.35；在 $260 m\mu$ 的克分子消光係數 $\epsilon \cdot 10^{-3} = 14.84$ 。

經亞硝酸或脛胺處理，這個化合物的紫外光吸收圖譜沒有變化；與 1 N HCl $100^\circ C$ 保溫 1 小時， $295 m\mu$ 的小峯消失，吸收高峯稍向右移，幾個不同波長的光吸收比值亦有

改變；與 1 N NaOH 100°C 保溫 1 小時，吸收高峯移到 254 m μ ，低峯移到 223 m μ ；過氯酸加熱處理後的光吸收改變情況與 1 N HCl 熱處理類似，295 m μ 的小峯亦消失，說明這個化合物對酸鹼在加熱的情況下不穩定；在室溫條件下可與溴作用，產物的紫外光吸收圖譜與原化合物完全不同，高低峯均消失；Wheeler 氏顏色反應呈陰性。

紅內光譜分析結果：吸收頻率自 1400—600 cm⁻¹ 間波形較複雜，出現數個吸收高峯，很可能是雜環芳香化合物，1600 cm⁻¹ 附近有吸收峯說明有 C=C 或 C=N 鍵存在，1660 cm⁻¹ 處的吸收峯可能由於 C=O 基所致，3400 cm⁻¹ 尚有一強度不大的吸收峯，可能這個化合物含有 >NH 或 -OH 基。

這個化合物的紙電泳行為，以及它和離子交換樹脂交換的情形，都說明具有弱鹼性；不與亞硝酸作用，表示化合物不含伯胺基；與溴作用紫外光吸收高低峯均消失說明化合物含 C=C；與脛胺保溫，紫外光吸收圖譜不改變，以及 Wheeler 氏顏色反應呈陰性的結果，均證明 C=C 中至少有一個碳原子上的氫已被其他基團替代。綜合元素分析，電泳行為，化學性質，紫外及紅內光譜分析的結果，推想這個化合物的結構，有可能是由四個碳原子和二個氮原子所組成的雜環化合物，雜環中二個氮的位置可以是鄰位，間位或對位，從紫外光吸收情形來看，兩個氮原子為鄰位或對位的噁嗪或吡嗪的衍生物的吸收高峯大多在 300 m μ 附近，與這個化合物相差頗大，噁啉衍生物如尿噁啉等的吸收光譜與它頗接近，所以這個化合物結構為噁啉環的可能性最大，它的構造式可能是：



式中 R 代表烷基或氫。至於結構的最後肯定，尚有待於將化合物合成並得到同樣的性質與元素分析的結果，才能證明。

家蠶及蓖麻蠶絲腺腺體核糖 核酸的結構分析

劉新垣 王德寶

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

絲腺腺體的主要功能是合成絲蛋白, 絲蛋白的氨基酸組成特殊, 家蠶 (*Bombyx mori*) 絲蛋白含甘氨酸 42.8%, 丙氨酸 32.4%……蓖麻蠶 (*Attacus ricini*) 絲蛋白含甘氨酸 27.8%, 丙氨酸 50.5%……酵母蛋白質的氨基酸組成與絲蛋白比較則相距甚遠, 推斷酵母 RNA 的結構與絲腺 RNA 應該有所不同。即使家蠶與蓖麻蠶 RNA 也可能有些異差。作者曾經研究過(未發工作)啤酒酵母, 麵包酵母 sRNA 及 HRNA* 的結構, 本工作將報告家蠶及蓖麻蠶 sRNA 及 HRNA 的結構分析。

絲腺取自五嶺 5—7 天(即上簇前 1—2 天)的蓖麻蠶(申藍)及家蠶(華九雲漢)凍干後按 Crestfield 法及 Kirby 法制備總 RNA, 再用 NaCl 分離 sRNA 與 HRNA, 不同批次制備的產品質量基本相符, 不過 sRNA 中有時會混有 HRNA, 此時如將 sRNA 再用 NaCl 提取 1 次, 則 HRNA 留在沉渣中而被除去。

製得的 RNA 用 1M HCl 水解測定其碱基組成, 用牛胰核糖核酸酶水解及兩相電泳層析圖譜法分離酶解產物以分析其結構。計算時以每毫克 RNA 中所含 PypCpNp** 的微克分子數為 100, 其他結構以其百分數表示之。

兩種絲腺 HRNA 的碱基組成基本相近, Matthews 也分析過蓖麻蠶 RNA 的碱基組成, 他所報告的結果與本工作中蓖麻蠶 HRNA 相符, 他沒有分析 RNA 的結構, 僅測定其碱基組成, 碱基組成固然反映一定的結構規律, 但結構分析會更靈敏地發現不同 RNA 的差別, 兩種絲腺 HRNA 的碱基組成雖然相近, 但其結構則有相當差別, 家蠶絲腺 HRNA 中所含 PypApCpNp, PypApUpNp, PypGpUpNp, PypUpNp 等結構的百分數高於蓖麻蠶, 而 PypGpCpNp 則略低於蓖麻蠶。

兩種絲腺 sRNA 的結構表現出一定的差異, 家蠶絲腺 sRNA 中所含 PypApApCpNp, PypApApUpNp, PypApCpNp, PypGpCpNp, PypApUpNp, PypGpUpNp, PypUpNp 等結構的百分數均高於蓖麻蠶絲腺 sRNA, 此外家蠶及蓖麻蠶 sRNA 酶解圖譜中都含有一些由稀有碱基組成的二核苷酸。

同一來源絲腺 sRNA 與其 HRNA 有顯著的差別。HRNA 其所含 PypApApApCpNp, PypApApCpNp, PypApCpNp, PypApUpNp, PypGpCpNp, PypGpUpNp, PypUpNp 等結構的百分數均較 sRNA 高很多 PypApApApCpNp 及 PypUpNp 尤為顯著。前者在 sRNA 中幾乎找不到, 啤酒酵母及麵包酵母 sRNA 或 HRNA 也有類

* HRNA: 大分子核糖核酸。sRNA: 可溶性核糖核酸。

** Ap, Gp, Cp, Up, Pyp 分別代表腺嘌呤, 鳥嘌呤, 胞嘧啶, 尿嘧啶, 嘧啶的單核苷酸。Np 代表注意單核苷酸。

似的規律。在家蠶, 蓖麻蠶, 啤酒酵母, 麵包酵母, 四種來源 HRNA 的嘍啶堆中, $U_p > C_p$, 而 sRNA 嘍啶堆中則 $C_p > U_p$, $\frac{C_p}{U_p}$ 比值, sRNA 約為 HRNA 的兩倍。

分析了四種來 sRNA, HRNA 的結構之後發現兩種酵母之間較為接近。兩種絲腺有一定差異, 而絲腺與酵母則相差甚遠。

(蓖麻蠶由中國科學院實驗生物研究所曹梅訊同志贈給, 家蠶由中國農業科學院蠶業研究所呂鴻聲同志贈給。某些技術工作承商金寶同志協助一並致謝)。

2-硫尿嘍啶對大腸桿菌中硝酸 還原酶誘導形成的影響

沈思祥 沈寅初 沈仁權

(復旦大學生物系, 上海)

關於應用鹼基類似物來進行核酸結構和蛋白合成關係的研究, 文獻上已經有不少記載: Creaser 研究了 8-氮鳥嘌呤對金黃色葡萄球菌中 β -半乳糖苷酶形成的影響; Naono 等人研究了 5-氟尿嘍啶對大腸桿菌中 β -半乳糖苷酶及鹼性磷酸酯酶形成的影響; Hamers 等人研究了 2-硫尿嘍啶對大腸桿菌中 β -半乳糖苷酶形成的影響, 並獲得了不具酶活力但具免疫相關性的蛋白質。前人的結果都說明鹼基類似物參入了核糖核酸, 導致蛋白質結構的改變, 因而喪失了酶活力。這些實驗都沒有肯定鹼基所參入的是那一種 RNA? 那一種 RNA 又是和蛋白質結構的關係最為密切? 直到最近 Champe 和 Benzer 用 5-氟尿嘍啶研究大腸桿菌中 T4 噬菌體 rII 突變型的回復突變時才認為 5-氟尿嘍啶所參入的是信息傳遞體 RNA。我們選擇了大腸桿菌的硝酸還原酶作對象, 觀察了 2-硫尿嘍啶對該酶誘導形成的影響, 企圖獲得一些新的資料。

硝酸還原酶所催化的是硝酸根離子還原為亞硝酸離子的反應。大腸桿菌在含有 NO_3^- 的基本培養基上繁殖時, 或先在不含 NO_3^- 的基本培養基上繁殖後再懸入含有 NO_3^- 的誘導液中保溫 10 分鐘後, 都可以觀察到硝酸還原酶的活力。我們所用的菌種是大腸桿菌 P15。在不含 NO_3^- 的培養基上繁殖後如不加以誘導, 酶的活力極低, 也就是說這個菌株內組成部分的硝酸還原酶含量是很低的。酶活力定量測定是根據所形成的 NO_2^- 的量的測定而進行的。在進行酶活力測定時樣品中都加入一定量的氯黴素, 使酶的繼續形成終止。

實驗結果如下:

一、誘導動力學觀察: 取在不含 NO_3^- 的基本培養基內繁殖的細菌, 懸入含有 NO_3^- 的誘導液中, 分別在 10、20、30 分鐘末取出樣品, 進行酶活力測定。測定得酶活力是和誘導時間成直線增加的關係。如在誘導液內同時加入 2-硫尿嘍啶, 使最後濃度為 50 mg%, 同樣在四個不同時間內取出樣品測定酶活力。在這種情況下誘導 30 分鐘的樣品中的酶

活力也只不過相當於無 2-硫尿嘧啶時誘導 3 分鐘時的活力，而且即使延長到 60 分鐘酶活力也不顯然增加。

二、在誘導時加入不同濃度的 2-硫尿嘧啶對於硝酸還原酶活力的影響：在誘導液中加入 2-硫尿嘧啶使最後濃度為 10 mg % 時已有顯著的影響，此時酶活力約為對照的 60%。當 2-硫尿嘧啶增加到 30 mg % 時，酶活力祇有對照的 5% 左右。這種影響主要並不是由於 2-硫尿嘧啶對已經形成的酶的活力的抑制，因為用已經誘導好的細菌懸液中加入 2-硫尿嘧啶，抑制作用一般祇在 10% 以內，雖然有時因條件控制不嚴，偶然也會出現過接近 50% 的抑制作用。這種抑制作用在本質上也和在誘導時加入 2-硫尿嘧啶的影響不同：前者不能被天然鹼基所解除，而後者則可被天然鹼基所解除。

三、天然鹼基對 2-硫尿嘧啶影響的解除：如果在誘導時除加入 2-硫尿嘧啶（最後濃度為 50 mg %）外再加入尿嘧啶（最後濃度為 50 mg %），便可以使酶活力恢復達到對照組（不加 2-硫嘧啶和尿嘧啶）的 86%。腺嘌呤和鳥嘌呤完全沒有解除作用，胞嘧啶的作用僅略次於尿嘧啶。胸腺嘧啶的解除效應並不顯著，僅 7% 左右。

四、在繁殖過程中加入 2-硫尿嘧啶對於硝酸還原酶誘導形成的影響：大腸桿菌接種在含有濃度為 100 mg % 的 2-硫尿嘧啶的基本培養基內，達到對數期後，收穫洗淨，然後進行誘導，誘導 20、25、30 分鐘後分別取樣測定，測得酶活力直線上升，它和在不含 2-硫尿嘧啶的培養基內繁殖的細菌經誘導後的酶活力幾乎一樣，並沒有受到顯著的影響。

五、誘導過程中分段加入 2-硫尿嘧啶對酶合成的影響：在基本培養基中繁殖的細菌懸液在含有 NO_3^- 的誘導液中進行誘導，在 10、20、30 分鐘未加入 2-硫尿嘧啶（最後濃度為 50 mg %），取出一份樣品測定酶活力，另外一份則繼續保溫一定時間後測酶活力，結果表明在加入 2-硫尿嘧啶後硝酸還原酶的形成幾乎立即停止。

從上面的實驗結果看來，可以認為 2-硫尿嘧啶對硝酸還原酶的誘導形成有抑制作用。從胞嘧啶和尿嘧啶的解除作用看來，也可以初步認為 2-硫尿嘧啶參入了與合成硝酸酶有關的核酸中，更為可能的是 RNA，而不是 DNA。在 2-硫尿嘧啶中繁殖的細菌的硝酸還原酶的誘導形成照常進行，不受限制，這和 2-硫尿嘧啶對大腸桿菌 P 15 的 β -半乳糖苷酶的影響顯然不同（江行娟等，未發表）：細菌在 100 mg % 的 2-硫尿嘧啶中繁殖到對數期，收穫洗淨，用含乳糖的誘導液加以誘導時， β -半乳糖苷酶的活力在多次實驗中都有極為顯著的降低，酶活力僅達對照的 3—40%。本文所報導的實驗事實足以支持 Jacob 等人所提出的信息傳遞體假說，因為根據這一假設可以設想在誘導時才有和硝酸還原酶有關的大量 *m*-RNA 形成，因此也祇有在誘導時加入 2-硫尿嘧啶才能參入這部分 RNA，從而改變它的結構，於是就不能合成正常的酶蛋白。但是 β -半乳糖苷酶的例子却不能這樣來解釋，似乎決定 β -半乳糖苷酶結構的核酸不僅僅是 *m*-RNA，而可能和核糖核蛋白體或 *s*-RNA 都有一定的關係。再從誘導過程中分段加入 2-硫尿嘧啶的實驗結果看來，也認為可以支持 Jacob 等人提出的 *m*-RNA 是不穩定的假說，因為如果 *m*-RNA 是穩定的，那麼在加入 2-硫尿嘧啶之前所形成的 *m*-RNA 必然還可以繼續起作用，因此在誘導中途加入 2-硫尿嘧啶後酶活力仍將繼續增加，而事實却與此相反。

X-射綫對小牛胸腺 DNA 的 隱藏破壞作用

II. 射綫導致的氫鍵不穩定性

李載平 錢肖貞 景沛

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

前文中, 我們曾報告, 小牛胸腺 DNA 在有保護物質存在之下, 可經受 6×10^4 倫照射而無降解發生; 但照射後即導致隱藏破壞, 並與劑量成正比地發展。大分子的降解是隱藏破壞累積的結果。即單鍵打斷的累積導致雙鍵對映部位同時打斷而產生分子的降解。本文報導在沒有保護物質存在之下可以進一步證明前述的論點。而且在較低劑量下, 即近於一般整體照射所用的劑量水平, 利用可以檢查隱藏破壞的方法, 離體照射 DNA 也可以測出無大分子降解的結構破壞。並提出實驗根據, 說明隱藏破壞導致的氫鍵不穩定性與氫鍵破壞之間的區別。

小牛胸腺 DNA 360 樣品係按 Zamenhof 法製備; 在 $0-4^\circ\text{C}$ 冰箱內, 經 0.2 M NaCl 透析 48 小時, 換外透液 5—6 次, 不同劑量照射後, 按前文所述的方法測定還原粘度 (η_{sp}/C)。結果表明, 當劑量小於 1000 倫時, DNA 大分子並無降解, 但是 76°C 保溫 60 分鐘則還原粘度下降, 這表明已產生明顯的隱藏破壞。隨劑量增大, 隱藏破壞發展而出現分子降解。

利用甲醛反應也證明了上述隱藏破壞發生於分子降解之前的規律。未照射的 DNA 在 1% 甲醛溶液中 70°C 保溫 15 分鐘, 並無紫外吸收的改變, 而 1000 倫照射後, 雖然不導致分子降解, 但 70°C 保溫 15 分鐘可使紫外吸收發生明顯的增高。另一方面由 T_m (紫外吸收增高達 $\frac{1}{2}$ 最高值的溫度) 的變化看來, 未照射的 DNA 為 78.3°C , 500 倫及 1000 倫照射後分別降低為 77.3°C 與 76.4°C 足見, 利用檢查隱藏破壞的方法, 可以觀察到小劑量照射所引起的 DNA 結構損傷, 這個離體照射的劑量可以低至一般整體照射的劑量水平。

隱藏破壞的主要表現為氫鍵的不穩定性。如前所述, 照射後的 DNA 與未照射的 DNA 相比, 可以在較低的溫度就出現粘度下降、紫外吸收增高、甲醛反應順暢進行等。此外, 降低溶液的 pH, 照射後的 DNA 也表現有較高的氫鍵不穩定性; 若以 $\text{pH} \frac{1}{2}$ 表示引起 DNA 的氫鍵破壞而使 η_{sp}/C 下降為原二分之一的 pH 值, 則未照射 DNA 的 $\text{pH} \frac{1}{2}$ 為 2.9, 6×10^4 倫照射後增高為 3.3。由引起 η_{sp}/C 下降 10% 的 pH 值分析, 前者為 3.4 而後者為 4.0。一些其他方法也可利用於檢查氫鍵的不穩定性。

射綫導致的氫鍵不穩定性與射綫直接引起的氫鍵破壞二者之間是有明顯區別的。曾經 100°C 保溫變性的 DNA, 加甲醛後可在室溫 (25°C) 立即反應而紫外吸收增高。經過照射的 DNA 雖然紫外吸收略有增高, 反映了少數氫鍵的破壞; 但加入甲醛後紫外吸收並無改變, 必須提高溫度保溫, 才能使紫外吸收進一步地提高, 而且都還保持着與一定溫

度範圍相關的 S 形曲綫。另一方面，我們已知，DNA 二級結構的破壞，會使其與金屬離子結合的能力大為下降。我們以紫脲酸銨為指示劑作光譜滴定，也證明了 DNA 在 100°C 保溫變性後與 Cu^{++} 結合的能力便顯著地下降。而 6×10^4 倫照射却並無影響。這都說明經過照射的 DNA 分子即或已有顯著的降解。但雙螺旋氫鍵結構系統並未遭受嚴重破壞。可見在研究射綫對 DNA 結構的破壞中，若不注意氫鍵不穩定性的存在，應用影響氫鍵穩定性的條件來研究氫鍵的破壞，必然導致解釋上的混亂。

我們認為單鍵的斷裂可以造成 DNA 雙螺旋結構的氫鍵不穩定性。另一方面，在單鍵斷裂的末端，特別是位於雙螺旋大分子發生降解的末端，必然有氫鍵的破壞。因此，照射後出現的氫鍵不穩定性與由照射直接引起的氫鍵破壞可能都是單鍵斷裂引起的結果。

整體 X-射綫照射對大白鼠胸腺核蛋白 (DNP) 的影響

張永蓮 張友端

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

電離輻射的各種生物效應，如細胞分裂之受抑制，染色體的折裂，遺傳突變等都指出細胞核或其組成部分的損傷可能是較關鍵性的問題，離體實驗也有不少證據說明脫氧核糖核酸 (DNA) 及 DNA 蛋白 (DNP) 在生物大分子體系中間是對輻射最敏感的。但是整體照射實驗中却不易測出明顯的分子水平較原初的變化。因而 Hagen 關於照射引起 DNP 穩定性變化的報導值得重視。他利用 Kirby 的酚——鹽 (如三氯乙酸鹽 TCA) 處理組織勻漿以分離 DNA 與蛋白的方法，以在一定鹽濃度的條件下，DNA 抽入水層的量判斷 DNA 與蛋白結合鍵的穩定性，發現照射後胸腺組織水勻漿的 DNP 在同樣鹽濃度條件下較正常組織 DNP 之抽提率為高，以為可能是照射破壞了某些 DNP 的金屬鍵，使之更易於抽提之故。這種抽提率的變化出現得很早，對小劑量如 50 倫也有反應，並且變化程度與劑量成正比。這種變化的敏感度似乎是以 DNA 粘度或層析行為等為指標的工作中，不易見到的，因而引入興趣。但是顯然，從研究射綫原發損傷的性質的角度而言，這種變化的意義要取決於其原初程度。胸腺是對射綫極為敏感的，小劑量照射後立刻有大量細胞死亡，在組織學上表現為細胞固縮率的增加，以及較後期細胞數的銳減，抽提率的變化究係發生在細胞死亡後抑死亡之前？是極重要的問題。我們就這一點做了比較細致的分析：

參考了 Kirby 的抽提方法，並做了小修改，我們首先重複了 Hagen 的觀察。發現了同樣趨勢的結果，即以抽提率 (即水層 DNA 的量與勻漿 DNA 總含量之比) 對鹽濃度作圖，照射 800 倫的大白鼠胸腺勻漿比正常動物胸腺勻漿的 DNA 抽提曲綫移向較低的鹽濃度，但是仔細分析在不同鹽濃度下照射引起的抽提率提高是不盡相同的，特別是 1.5% 及 1.0% TCA 之差別尤為有趣：

(1) 以動物照射 800 倫後變化的時間曲綫來看，1.0% TCA 抽提率的增加隨照射後時間增長而增加，達到一定水平後不再有變化。而 1.5% 抽提率的增加很快，達到一個高峯後旋即下降。這種趨勢與胸腺細胞在照射後固縮率變化曲綫極為相似，即固縮率隨時間增長達高潮後，由於固縮細胞被吞噬細胞移出組織故反而下降。兩者的高峯都出現在照射後 6 小時左右。

(2) 照射劑量與抽提率變化的關係則表現為 1% TCA 抽提率隨劑量上升到 300 倫時達 15% 左右後即不再變化，而 1.5% TCA 抽提率則一直與劑量成比例關係。後者的情況又與固縮率變化完全相同。

(3) 利用我們過去發現的比較專一性地減低胸腺細胞固縮率的一種藥物(代號 104)，我們也能看到 1.5% 抽提率變化受到更為明顯的防護，遠高於 10%，雖然此種藥物就動物存活率來判斷是沒有保護作用的，另一方面，用已知藥物 AET 及我們過去發現的 C 10 (代號) 等對存活率的提高起一定作用的藥物，其實驗結果則 1.0% 與 1.5% 之差別就不大了。

(4) 離體培養的胸腺細胞懸浮液由於處在不够理想的生理條件下，死亡後常不固縮。此時 1.0% 及 1.5% TCA 之抽提率變化的差別也相應減少。

以上一些實驗結果指出：1.5% TCA 之抽提率變化與固縮細胞有密切關係，固縮既是死亡以後的現象，其抽提率反映的 DNP 改變只能是死細胞的變化，不足以做為損傷指標。

至於 1% TCA 所能抽提的 DNA 在正常情況下極低，照射後隨時間或劑量而升高，但有其極限在兩種關係中最高都在 15% 左右，似乎表示胸腺勻漿中 DNP 只有一部分在這樣低的鹽濃度作用下可以分離，而這部分 DNP 可能是穩定性較低，也可能是性質稍異。由於胸腺中的細胞組成比較均一，這部分 DNP 不像是代表某一類佔全體細胞約 15% 的特殊敏感細胞，更可能是由於相同的細胞中，都有這樣一部分敏感的 DNP，因而其變化很可能反映細胞的損傷，雖然這些細胞可以尚未死亡，上述的實驗結果與這種看法是相符的：首先是它不與固縮率成平行關係，其次是劑量大於 300 倫後對抽提率不再有顯著的影響，這種結果可以解釋為這時全部細胞都遭受了這種抽提條件所能反映的損傷，因而繼續增加劑量不能產生更大的效果，300 倫足以損傷全部細胞的設想是與 Trowell 的結果相符的，不過他是以照射後 48 小時遺留的胸腺細胞數目為指標的，而在我們的實驗條件下，在六小時後即能觀察到。以上的推論說明 1% TCA 抽提率做為反映射綫損傷的指標有一定的原初價值，值得進一步加以證實和研究。

(林良賢同志參加部分實驗工作)

大白鼠尿中脫氧核糖核酸酶 (DNase) 的研究

張清杰* 張友端

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

Kowlessar 等曾報告, 大白鼠經整體照射後, 尿中 DNase 活力升高。由於 DNase 活力改變必然與脫氧核糖核酸的代謝密切相關, 不少放射工作者試圖以尿中 DNase 活力作為射綫損傷的診斷指標。近年來有關 DNase 的研究已有不少進展, 研究方法也不斷改進。新的成就都指出, 對於 Kowlessar 等早年所觀察的現象有必要作進一步探討。我們就大白鼠尿中 DNase 的測定方法和 X-射綫整體照射對其影響進行一些研究, 獲得了以下結果:

1. Kowlessar 等以二苯胺法測定酶作用產物作為 DNase 活力指示。我們發現尿為一複雜系統, 其內含物對二苯胺發色有嚴重干擾, 不能反映 DNase 的實際活力, 只有將尿透析處理後, 二苯胺法方能使用。此外利用 Kurnick 甲基綠法從底物的變化觀察酶活力, 也可得到較可靠的結果。

2. 我們採用上述兩種不同方法分析了透析尿中 DNase 的反應條件, 得到相同的結果。發現只有一個最適 pH 高峯, 在 6.5 附近, 此可能為 DNase I 與 DNase II 共同作用的結果。為了區分兩酶的最適 pH, 曾觀察了激活劑和抑制劑的影響, 發現在反應液內加入 0.01 M 砷酸鹽時, 在 pH 5.6 和 7.6 出現兩個高峯。在兩種 pH 條件下都需要 Mg^{++} 激活, 並且與 Kurnick 看法相符, 即其最適濃度與 pH 相關, 較低的 pH 條件下要求 $[Mg^{++}]$ 較高。pH 5.6 時的酶活力隨 $[Mg^{++}]$ 之增加而升高, 到 $[Mg^{++}]$ 為 0.025 M 時達最高值。繼續增加 $[Mg^{++}]$ 沒有抑制現象出現。pH 7.6 酶活力則在 $[Mg^{++}]$ 為 0.012 M 時即到達最高值。

3. 用甲基綠法比較透析前後尿中 DNase 的活力, 發現尿對水透析 24 小時, DNase 活力顯著下降, 加入於 100°C 煮過一小時的全尿可使活力全部恢復。實驗結果指出, 尿中含有可透析對熱穩定的 DNase 激活因素。

4. 動物經 X-射綫整體照射 500 倫, 尿中 DNase I 和 DNase II 活力增高 2—3 倍。對水透析後, 射綫影響不明顯, 加入煮過的尿, 射綫效應又全部表現。加煮過的照射組尿於正常尿中或煮過的正常尿於照射組尿中, 均只引起活力部分升高。這些結果指出了照射引起的 DNase 活力增高可能是酶蛋白本身和它的激活因素兩者都受了影響的緣故。

* 山西分院進修生

腎虛病人尿中 17-羥類固醇 排洩量改變的觀察

顧天爵 張麗麗 沈自尹 李亮

(上海第一醫學院生物化學教研組)

我院中醫教研組從以腎爲主的觀點出發，根據異病可以同治的法則，對於七種不同疾病（哮喘、紅斑性狼瘡、神經衰弱、心臟冠狀動脈硬化、子宮功能性出血、妊娠毒血症、硬皮病）進行辨證論治。他們先將患病者分爲腎陽虛與陰虛兩類型，然後分別用補腎陽與補腎陰的中藥複方醫治，均獲顯著療效。我們推想：相同腎虛的不同疾病可能具有共同的代謝調節機制失常，因而用相同補腎方劑可以糾正此種失常的共同機制。如果我們能夠找到有關調節機制中某種因素，則在臨床生化中祖國醫學理論研究有了新的途徑。

腎上腺皮質激素是人體調節代謝的重要因素之一。許多疾病表現着 17-羥類固醇在血液及尿中含量的改變，說明了腎上腺皮質激素的分泌或其代謝機制的失常，從而影響了其他物質代謝的失調。我們測定了腎陰虛與陽虛的七種疾病共 78 例的尿中 17-羥類固醇含量，由此發現腎陽虛病人確有腎上腺皮質激素分泌或代謝失常的事實存在。

本文採用 Reddy 方法^[1]測定尿中 17-羥類固醇含量。除 78 例腎虛病人的尿樣品而外，我們選擇了無腎虛的健康學生（年齡 23—30 歲）41 人的尿樣品測定值作爲正常對照。測定結果列於表 1 中。如表所示：41 位正常人的 24 小時尿中 17-羥類固醇含量平均值爲 7.72 ± 2.95 mg，其中男子 23 人的數值爲 8.16 ± 2.9 mg，女子 18 人的數值爲 7.33 ± 3.06 mg，腎陽虛病人 40 例的數值爲 2.50 ± 1.76 ，陰虛病人 38 例的數值爲 7.91 ± 4.51 。腎虛病人經中醫補腎藥物治療後，尿中 17-羥類固醇的含量均有升高（如表 2 所示）。腎陽虛者在治療的第二周末已回復至正常值，在隨訪的一至一個半月內，亦復正常。由此可見，我們觀察的病人雖有七種不同病種，但就其中共同表現的腎陽虛者而論，都有尿中 17-羥類固醇含量的降低。當陽虛症狀由於應用補腎藥物而改善時，則尿中 17-羥類固醇含量亦隨之回復至正常範圍。腎陰虛病人在治療前變動範圍較大，但多數在較高於正常值的水平，治療後雖有升高，變動幅度不見減小。尿中 17-羥類固醇含量是腎上腺皮質激素在體內合成，分泌與分解代謝的總結果，三者中任一因素失調均會發生尿中 17-羥類固醇含量的變化，因此欲探研上述腎虛病人 17-羥類固醇排洩量的失常的機制，需作進一步的分析研究。爲此，我們首先作腎上腺皮質對 ACTH 的應答性能試驗^[2]。當人體接受 25 單位 ACTH 靜脈滴注 8 小時連續兩天（共 50 單位 ACTH）後，正常的腎上腺皮質在滴注開始的 24 小時內，尿中 17-羥類固醇含量即達最高值（約爲對照值的 3—5 倍），此數持續至第二個 24 小時，第一個 24 小時內尿中的數值約爲第二個 24 小時數值的 1.80/1.75^[3]。我們以 11 位無腎虛之健康人作試驗，結果見表 3。在 20 例被試的腎虛病人中，有 7 例陽虛病人（佔 14 例陽虛病例中的半數）表現在第一個 24 小時內的反應低下，在第二個 24 小時始達正常高峯。此組病人對 ACTH 的刺激能達正常的最高值，但在反應時間上則顯著延遲。這種

現象正如甲狀腺機能低下症者一樣。甲狀腺機能低下症患者對 ACTH 的應答試驗亦有兩種情況，一類反應正常，一類反應延遲^[3]。由於腎陽虛的反應延遲組腎上腺皮質尚能達到最高反應值，因此可以認為其皮質尚無器質性的損喪，但功能已發生障礙，此種障礙可能是由於長期受體內分泌過量的 ACTH 所造成的衰竭，或者恰恰相反，而是由於體內 ACTH 分泌太少（其原因亦可能是衰竭引起），以至平時皮質少受 ACTH 的刺激，所以對注入的 ACTH 亦表現反應失靈的一種惰性現象，以這種推論可以理解中醫的久病及“腎”的意義。或是其他原因，尚待今後作進一步的研究。

表 1 腎虛病人及正常人 24 小時尿中 17-羥類固醇的含量

| 病 種 | 性 別 | 腎 陽 虛 | | 腎 陰 虛 | |
|-----------------|-----|-------|-----------------------|-------|-----------------------|
| | | 例 數 | 尿 中 17-羥 mg/24 小時尿 | 例 數 | 尿 中 17-羥 mg/24 小時尿 |
| 哮喘 (87 例) | 男 | 16 | 3.06±1.62 (P<0.01) | 8 | 10.38±3.9 (P>0.10) |
| | 女 | 8 | 2.75±2.04 (P<0.01) | 5 | 11.4 — |
| 神經衰弱 (18 例) | 男 | 6 | 2.67±1.5 (P<0.01) | 5 | 9.3±4.1 (P>0.50) |
| | 女 | 1 | 2.60 — | 6 | 4.0±0.37 (P<0.01) |
| 紅斑性狼瘡 (7 例) | 男 | — | — | 1 | 6.25 — |
| | 女 | — | — | 6 | 6.16±3.84 (P>0.10) |
| 硬皮病 (6 例) | 男 | 1 | 1.30 | — | — |
| | 女 | 5 | 2.90±1.62 | — | — |
| 其 他 (10 例) | 男 | 1 | 2.30 | 3 | 9.20 |
| | 女 | 2 | 0.90 | 4 | 4.30 |
| 總 人 數 | — | 40 | 2.50±1.76 (P<0.01) | 38 | 7.91±4.51 |
| 正 常 人 (41 例) | 男 | 23 | 8.1 ±2.9 | | 7.73±2.95 |
| | 女 | 18 | 7.33±3.06 | | |

表 2 腎虛病人在補腎藥物治療前後 24 小時尿中 17-羥類固醇的含量

| 腎虛類型 | 治 療 前 後 | | 例 數 | mg 17-羥類固醇/24 小時尿 | | |
|------|---------|-----|-----|-------------------|--------------|--------|
| | | | | 平 均 值 | 範 圍 | P 值 |
| 陽 虛 | 治 療 前 | | 15 | 3.24±0.46 | (0—6.56) | — |
| | 治 療 後 | 第一週 | 15 | 7.64±0.82 | (2.95—18.3) | P<0.01 |
| | | 第二週 | 15 | 10.30±0.82 | (5.04—15.7) | P<0.01 |
| 陰 虛 | 治 療 前 | | 13 | 9.87±1.6 | (2.40—24.6) | — |
| | 治 療 後 | 第一週 | 13 | 10.52±1.7 | (3.35—2.9) | — |
| | | 第二週 | 13 | 10.73±1.7 | (4.80—30.50) | — |

* P 值與同性正常值相比

表3 正常人及腎虛病例的腎上腺皮質對促腎上腺皮質激素 (ACTH) 應答試驗的結果 (24 小時尿中 17-羥類固醇含量的改變)

| | | 人數 | 對照 | 第一 天 (滴注 25 單位 ACTH) D ₁ | 第二 天 (滴注 25 單位 ACTH) D ₂ | D ₂ /D ₁ | 第三 天 (未滴注 ACTH) |
|-------|------|----|-----|---|---|--------------------------------|--------------------|
| 正 常 人 | | 11 | 6.0 | +18.8 | +19.4 | 1.03 | -3.3 |
| 陽 虛 | 反應正常 | 7 | 2.2 | +22.3 | +28.7 | 1.18 | +0.6 |
| | 反應延遲 | 7 | 2.9 | + 1.15 | +20.6 | 17.84 | +7.9 |
| 陰 虛 | | 6 | 7.7 | +11.7 | +17.6 | 1.56 | -3.1 |

參 考 文 獻

- [1] W. J. Reddy: Modification of the Reddy-Jenkins Thorn methods for the estimation of 17 hydroxy corticosteroids in urine *Metabolism*, **3**, 499, 1954.
- [2] W. J. Reddy, George W. Thorn, John. C. Laidlaw *Advances in the diagnosis of altered states of adrenocortical function.*
The new *England Journal of medicine*, **253**, 747, 1955.
- [3] Jean-Pierre Felber W. J. Reddy: Adrenocortical Resparse to the 48 hours Acth test in myxedema and Hyperthyroidism *Journal Clinical Endocrinology*, **19**, 896, 1959.

腎虛病人的能量代謝研究

I. 腎虛病人之基礎代謝與紅血球中糖的分解代謝

何開玲 李 亮 黃華樓 沈自尹
肖能慮* 姜惠馨* 林茂芳* 高益芝*

(上海第一醫學院生化教研組)

祖國醫學認為“腎”主命門之火，並視命門為生命的根本。在多種不同疾病中發現有腎的陰陽失調現象，用共同的調整腎陰腎陽的治法，能獲得極好的療效。借助於近代生物化學來認識腎虛的病理機制，是研究祖國醫學理論的一個新途徑。臨床上常觀察到病人一旦發生腎的陰陽失去平衡，即會有陰虛生“熱”，陽虛生“寒”的症狀。此“寒”與“熱”雖屬病人主訴，但經中藥調整後，此等症狀均可消失。因此我們推測其必有物質基礎，最可能的是與能量代謝發生障礙有關，而藥物治療作用的一種機制可能在於對能量代謝的調整。因此，我們企圖從機量代謝的角度上，對腎的陰陽失調進行探討。本文報告了一些腎虛病人能量代謝方面的測定以及其變化機制的討論。

本文所擇研究的病例為上海第一醫學院臟像專題研究組以補腎藥物治療有顯著療效者，其中包括哮喘、神經衰弱、硬皮病、功能性子宮出血、血小板減少性紫癜等種，治療中陰

* 1961 年上海第一醫學院生化專業班學生。

藥以熟地、燻肉、山藥為主，陽藥以補骨脂、杜仲、巴戟肉、桂枝為主。

我們選擇了基礎狀態時的呼吸商以及紅血球中糖代謝率作為測定指標。前一指標代表整體能代謝的全貌，後一指標是代表某一特定組織中產能代謝的變化。衆所周知，成熟的血球中只存在酵解及磷酸戊糖通路兩條糖分解途徑，戊糖通路的產能意義尚不明確，而且所佔耗糖比例又極小，因此紅血球的能量幾乎全部是由糖酵解所供給。為了探明病人陰陽失調是否在紅血球中這兩條糖代謝途徑的耗糖比例變化上反映出來，我們對它們進行了平行的觀察。

用 Böhlaus 體力檢驗儀測定病人在治療前後之基礎代謝的呼吸商，同時測定無腎虛見症的正常值作為對照(表 1)。測定結果闡明：病人與正常人之基礎代謝率並無顯著差別，但病人經補腎藥物治療後症狀好轉時(約一至一月半)，其呼吸商都較治療前有不同程度的下降。我們推測這可能由於身體內糖的分解代謝減弱或合成代謝加強，甚至有部分糖積餘下來轉變成其他物質，支持此種推測的事實是病人在治療後，體重普遍增加 1—2 斤，最高者達到 6 斤之多。此外，斐曼雲等曾報告白鼠在飼餵六味地黃丸(熟地、燻肉、山藥、丹皮、茯苓、澤瀉)後，肝糖元增加，這一實驗結果也佐證了我們的推論。

表 1 正常人與腎虛病人的呼吸商

| 組別 | | 例數 | 平均值 | 範圍 |
|-------|-----|----|-----------|-----------|
| 正 常 人 | | 11 | 0.87±0.13 | 0.73—1.00 |
| 腎陽虛 | 治療前 | 14 | 0.88±0.08 | 0.78—1.00 |
| | 治療後 | 14 | 0.80±0.12 | 0.70—0.96 |
| 腎陰虛 | 治療前 | 14 | 0.89±0.05 | 0.83—1.00 |
| | 治療後 | 13 | 0.81±0.09 | 0.70—0.95 |

紅血球糖代謝強度的測定是採用受試者清晨臥床休息時之空腹靜脈血液，以葡萄糖作底物，在 0.4 M pH 7.5 磷酸緩衝液中保溫 (37°C)，分別在無氧條件下測定 1 小時內每毫升比容 50 之血球懸液中乳酸增加微克數以及在瓦氏呼吸器中，有甲烯藍存在下測定氧吸收的微升數，由此分別表示紅血球之糖酵解及磷酸戊糖氧化通路的強度。從測定的結果(表 2) 看來腎虛病人之酵解率顯然與正常人不同。腎陽虛者未經治療時，其平均值僅為正常人之 76% 左右，而陰虛者反較正常值高出 47% 左右，當經治療後，兩組病人之酵解值都有改變，陽虛者的低值提高，陰虛者之高值下降，都向正常值靠攏。氧化率的變化不如酵解的變化大，在治療前，陽虛者與常人無顯著差異，陰虛者略高於正常，但在治療後也分別有上升或下降的趨勢。

此外，我們對少數病例的酵解作用在治療過程中的變化進行了多次測定，發現其強度隨着治療時間逐漸發生變化，陽虛者由低值逐步提高，而陰虛者相反漸漸減低，直至落至正常值範圍內(圖略)。

最後，我們為了鑒別上述代謝的變化是否為腎虛者所特有，測定了非腎虛哮喘病人之酵解及氧化強度，其值與正常人無大差別。由此可見，這些代謝變化確實涉及“腎”虛陰陽在失調所引致的“寒”與“熱”所產生。

由上測定結果可以看出，腎虛病人雖基礎代謝率無異於常人，但其紅血球的能量代謝

方面確有變化。如在紅血球中主要產能之糖酵解作用有顯著的變化：陽虛者減慢，陰虛者加強，同時在其中另一條道路上——糖的磷酸戊糖氧化通路也有相似的變化趨勢。在各組病例中，兩條糖分解途徑中耗糖量的比例都與正常組極近似。因此可以認為腎虛病人發生了紅血球糖分解代謝率的變化而並無兩條分解途徑間耗糖比例的改變。如此，顯然與耗糖 90%，以上的糖酵解關係更為密切。此種組織中糖代謝的變化規律可以推測是腎虛疾病中出現“寒”與“熱”等症狀的原因之一。中藥的治療起到了調整能量代謝的作用。

表 2 正常與腎虛病人紅血球糖酵解與氧化強度的變化(比容 50 毫升)的紅血球在 37 度保溫 1 小時的數值

| 組 別 | | 酵 解 強 度 | | | 氧 化 強 度 | | |
|--------|-----|---------|--|------|---------|--|------|
| | | 例 數 | 乳酸增加 μg | 耗糖 % | 例 數 | 氫化吸收 μl | 耗糖 % |
| 正 常 組 | | 28 | 492.4±57.1 (367.6—588.0) | 92 | 20 | 31.9±7.2 (21.0—45.7) | 8 |
| 陽虛組 | 療 前 | 20 | 375.0±92.1 (290.0—561.1) $P < 0.01$ | 91 | 18 | 28.0±6.4 (19.4—45.9) $P > 0.05$ | 9 |
| | 療 後 | 13 | 551.9±156.4 (348.0—873.1) $P < 0.01$ | 91 | 13 | 40.2±12.4 (23.9—60.5) $P < 0.01$ | 9 |
| 陰虛組 | 療 前 | 9 | 727.8±211.4 (477.0—1190.0) $P < 0.01$ | 93 | 9 | 39.7±7.9 (26.5—52.8) $0.05 > P > 0.01$ | 7 |
| | 療 後 | 9 | 545.2±90.7 (400.0—718.6) $0.05 > P > 0.01$ | 93 | 9 | 28.6±7.5 (19.0—42.6) $0.05 > P > 0.01$ | 7 |
| 非腎虛哮喘組 | | 4 | 450.5±72.8 (370.0—490.0) $P > 0.05$ | 90 | 4 | 38.5±6.0 (30.2±46.1) $P > 0.05$ | 10 |

酵解反應體系含 1 毫升比容 50 ± 5 之紅血球懸液 3 毫升含 60 微克分子之 pH 7.5 0.4 M 磷酸緩衝液。

氧化反應體系含 0.5 毫升比容 50 ± 5 之紅血球懸液 1 毫升 30 微克分子之 pH 7.5 0.4 M 磷酸緩衝液及 0.3 毫升 0.05% 甲稀溶液。

療前之 P 值為正常組對比值，療後之 P 值為與療前組對比值。

腎虛病人的能量代謝研究

II. 促腎上腺皮質激素對紅血球糖代謝的影響

何開玲 李亮 張麗麗 陳惠黎

(上海第一醫學院生化教研組)

我們曾報導腎虛病人紅血球的糖分解代謝顯著異於常人。顧天爵等又發現腎陽虛病人每日尿中 17-羥類固醇排泄量減少,部分病人表現出腎上腺皮質對 ACTH 應答性的低落狀態。久已知道腎上腺皮質激素能抑制組織中糖的利用,但該激素對紅血球中糖代謝的影響情況尚不够清楚,文獻上常出現相互矛盾的報導。如 F. Vaccari 等報導,一次注射大劑量的可的松引起家兔血液糖酵解增加,而注射促腎上腺皮質激素 (ACTH) 反能抑制其酵解的進行。近年 Luis Angelone 又提出正常大白鼠在連續注射可的松後,紅血球的糖酵解率減低 21%,而去腎上腺皮質之鼠却無變化,我們推想腎虛病人紅血球的糖代謝變化可能與腎上腺皮質的功能有關,故進行了滴注 ACTH 對皮質激素分泌功能及糖代謝影響的觀察。

受試者在 8 小時內接受靜脈滴注 ACTH 25 單位。在滴注前後各抽血一次,按 P. Demoor 等法測定血漿中氫可的松的含量,同時按何開玲等法測定其紅血球之糖酵解及氧化率,結果列於附表中。如表所示,無論正常人或病人,在滴注 ACTH 後,血中氫可的松的含量都一致升高,而紅血球中糖酵解率一致下降:正常人在滴注 ACTH 後,酵解率下降了 42%,腎陽虛患者在治療前降低 32%,在治療後下降 39%,各組之下降值無顯著差別。但滴注 ACTH 對紅血球中糖氧化率却大影響。

滴注 ACTH 前後血漿中氫可的松含量及紅血球中糖代謝率的變化

| 組別 | | 血漿氫可的松含量 | | 紅血球中糖代謝率 | | | |
|--------------|--------------|----------|--------------------------|----------|------------------------------|----|--------------------------|
| | | | | 酵解 | | 氧化 | |
| | | 例數 | μg/ml | 例數 | 乳酸增加 μg/ml | 例數 | 氧吸收 μg/ml |
| 正常組 | ACTH 滴注前後 | 13 | 18.5±4.3 (10.8—27.3) | 9 | 464.3±58.6 (367.6—553.0) | 12 | 31.2±6.3 (22.0—42.6) |
| | | 13 | 45.5±10.0 (21.6—64.5) | 8 | 247.4±96.3 (174.0—425.5) | 12 | 32.8±9.1 (20.1—49.6) |
| 腎陽虛組 (療前) | 前 | 6 | 16.3±3.25 (10.7—18.7) | 8 | 319.2±56.8 (180.0—488.0) | 12 | 31.5±9.2 (25.0—66.4) |
| | 後 | 6 | 52.8±8.0 (43.3—68.8) | 8 | 218.8±63.5 (113.5—405.0) | 12 | 34.5±9.6 (21.0—63.4) |
| 腎陰虛組 (療後) | 前 | 4 | 16.5±6.5 (11.0—27.3) | 4 | 507.0±106.3 (354.0—646.0) | 4 | 41.4±10.7 (29.4—57.4) |
| | 後 | 4 | 42.7±12.8 (20.5—65.4) | 4 | 309.3±39.9 (237.0—392.1) | 4 | 40.2±13.5 (19.3—58.5) |

從以上結果可以作出下列結論：

(1) 無論正常人和病人在滴注 ACTH 後，血中氫可的松含量都一致升高，表明腎虛病人之垂體—腎上腺皮質軸的調節機制正常，部分病人皮質的應答性較差，但不影響其血中氫可的松的水平。

(2) 紅血球的糖酵解受到 ACTH 滴注的抑制作用，其作用與皮質激素的增高相平行，當血中氫可的松含量增高時，紅血球的酵解即受到抑制，並且病人與正常人無顯著差別。因此推測到，ACTH 可能是通過增加血中皮質激素的濃度影響到血球中糖代謝。

(3) 滴注 ACTH 前後，紅血球中氧化支路的變化不大，因此認為其作用點在 6-磷酸葡萄糖以下的各酶促環節。關於此點進一步探討，我們目前已着手動物實驗觀察，但尚未達總結階段。

光合磷酸化的研究

VI. 2,6-二氯酚吡嗪酚光還原過程中有偶聯的磷酸化

沈羣懋 楊善元 沈允鋼

(中國科學院植物生理研究所, 上海)

在常用的希爾氧化劑中，2,6-二氯酚吡嗪 (DCPIP) 有它獨特的性質：(1) 電子傳遞的速度特別快；(2) 無顯著的偶聯磷酸化。一般認為，DCPIP 接受電子的部位在偶聯磷酸化之前，因此電子傳遞的過程短，反應速度快。但是上述現象用 DCPIP 具有解聯作用也同樣可解釋。

我們利用了高比放射強度的 ^{32}P ，得以測定不同濃度的 DCPIP 存在下短時間內(5—10 秒)的希爾反應和磷酸化活力。結果發現當 DCPIP 濃度低時，與其他人的報導相反，短時間內光合磷酸化的活力很大， P/O 值也達到 1。隨着 DCPIP 濃度的增加， P/O 值逐漸降低(表 1)。

表 1 不同濃度的 DCPIP 存在下葉綠體的光促電子傳遞及偶聯磷酸化

| DCPIP 的濃度 (微克/1.2 毫升反應液) | 電子傳遞速度 (μ atomo/毫克葉綠素/小時) | 磷酸化強度 (μ mole ATP/毫克葉綠素/小時) | P/O |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------|
| 80 | 670 | 15 | 0.02 |
| 40 | 590 | 138 | 0.23 |
| 20 | 446 | 167 | 0.37 |
| 10 | 400 | 422 | 1.05 |
| 5 | 440 | 458 | 1.04 |

照光時間除 5 微克/1.2 毫升的為 5 秒外，其餘均為 10 秒。

在實驗中我們發現 DCPIP 系統的光合磷酸化活力高於同量的 DCPIP H_2 系統，且

從表 1 可以看出,磷酸化活力與電子傳遞間有一定的關係($P/O=1$),肯定了 ATP 的形成是與 DCPIP 的光還原相偶聯而不是 DCPIP 的光還原產物 DCPIP H₂ 進行的氧化光合磷酸化的結果。

DCPIP 濃度高時 P/O 值降低很可能是由於 DCPIP 的解聯作用,這點在下述的實驗中得到證明。在沒有磷酸化系統存在下,葉綠體照光若干秒鐘後,在暗中立刻加入 ADP 及 ³²Pi,能够有少量的 AT³²P 形成表 2 的結果指出,在此情況下 ATP 的合成受 DCPIP 的抑制, DCPIP H₂ 則無影響。

表 2 DCPIP 及 DCPIP H₂ 對葉綠體系統預照後暗中 ATP 形成的影響

| 染料加入量 (微克/1.2 毫升反應液) | ATP 形成量 (μ mole ATP/毫克葉綠素) | |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | DCPIP | DCPIP H ₂ |
| 40 | 1.7 | 10.6 |
| 10 | 7.9 | 13.8 |
| 5 | 11.2 | 9.8 |
| 0 | 11.2 | 11.8 |

從上述的結果,可以看出 DCPIP 與其他希爾氧化劑一樣,接受電子的部位在偶聯磷酸化之後。其他工作者未能發現與 DCPIP 還原相偶聯的磷酸化的原因可能是:(1) DCPIP 的濃度過高,它本身的解聯作用使在全部還原過程中 APT 形成極少;(2)測定的方法不够靈敏,一般根據反應液中 Pi 的減少來測定磷酸化。

在文獻中,根據 DCPIP 光還原過程中未能測到顯著的磷酸化活力,不少作者假設 DCPIP 接受電子的部位在偶聯磷酸化之前,並由此對光合鏈的機制作了種種的推測。Jagendorf 認為不同希爾氧劑系統在釋氧方面都是共同的,DCPIP 光還原過程中沒有 ATP 的形成表示偶聯磷酸化發生在“光還原物”與外加希爾氧化劑之間的電子傳遞過程中。Arnon 發現將 DCPIP 和 K₃Fe(CN)₆ 同時加入葉綠體中,K₃Fe(CN)₆ 的還原加速,ATP 的形成受到抑制。結合了他的所謂“光合作用的統一學說”,Arnon 認為在此情況下電子的直接受體是 DCPIP,並進一步企圖利用 DCPIP 來區分綠色植物光合作用的兩個步驟——光合磷酸化與水的光氧化。根據本文的結果 DCPIP 光還原過程中同樣發生偶聯磷酸化,因此在電子傳遞的過程中 DCPIP 系統並沒有什麼特殊的地方,用它來作為分析光合鏈的工具是不妥當的。在 DCPIP+K₃Fe(CN)₆ 系統中,電子的直接受體大概仍舊是 K₃Fe(CN)₆ 而不是 DCPIP。K₃Fe(CN)₆ 還原的加速以及 ATP 形成受抑制的現象可以用 DCPIP 具有解聯作用來解釋。

生物化學反饋反應的研究

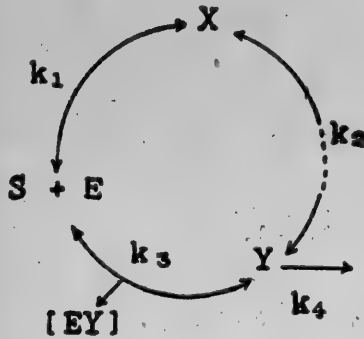
一、動力學的特性

徐京華 郁賢章

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

生物體的自動調節與人造的自動裝置的調節現象有很多相似之處, 反饋現象就是其中最重要的環節。但是這兩種自動調節的基本機制却很不相同。人造的裝置大都是用電或機械運動來實現調節的, 而生物體的調節現象却是一個非常複雜的化學和物理化學過程的綜合表現。近年來大量的實驗事實告訴我們, 在生物體內很多代謝過程都存在有反饋現象。因此使得我們覺得有必要對這類的反饋問題加以特別的探討。這對於我們進一步瞭解生命活動可能很有意義。本文是一個初步嘗試。

在代謝過程中最常見的是“終點”產物的負反饋現象。舉個例子某一酶 E 催化某個底物 S, 生成了 X, 它的速度常數為 k_1 。而後 X 又經過了一系列的反應變成了 Y, 其總和速度常數為 k_2 。Y 是酶 E 的抑制物。這就形成了一個負反饋循環。(見圖)



爲了簡化這個計算, 讓我們假定: 整個反饋過程所需的時間主要爲 k_2 所決定。Y 與 E 形成 [EY] 及 [EY] 分解速度與 X 變成 Y 相較要快得多。因此 Y、E 及 [EY] 之間很快就處於平衡狀態。如果這個抑制是非競爭性的, 那麼我們就有以下的關係:

$$\frac{d[EY]}{dt} = -k_{-3}[EY] + k_{+3}[Ef][Y] = 0 \quad (1)$$

$$[Et] = [Ef] + [EY] \quad (2)$$

$$[Ef] = \frac{K_i Et}{K_i + Y} \quad (3)$$

其中 [Ef] = 自由酶濃度; [Et] = 酶總濃度。

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

有了這個假定我們的動力學方程為：

$$\dot{X} = k_{+1} [E_f][S] - (k_{-1} + k_{+2}) X$$

$$\dot{X} = k_{+1} [S][E_t] K_i \left(\frac{1}{K_i + Y} \right) - (k_{-1} + k_{+2}) X \quad (4)$$

$$\dot{Y} = k_{+2} X - k_{+4} Y \quad (5)$$

將(5)微分代入(4), 經整理得:

$$\ddot{Y} + \alpha \dot{Y} + \beta Y - \frac{A}{K_i + Y} = 0 \quad (6)$$

其中 $\alpha = k_{-1} + k_{+2} + k_{+4}$; $\beta = k_{+2} k_{+4}$ 。

$$A = k_{+1} k_{+2} [E_t][S] K_i \quad (7)$$

如果我們有一個很大的底物源, 經常使[S]保持恆定。這個方程就是非線性二次方程。如果以上的抑制為競爭性的, 其方程形式是一樣, 所不同的是常數的數值。對負反饋來說我們以下限於討論這方程的解。

我們用近似的方法來求解。第一步假Y的值很小。我們可在Y=0附近把(6)展開。

$$\ddot{Y} + \alpha \dot{Y} + \beta Y - \frac{A}{K_i} + \frac{A}{K_i^2} Y - \frac{A}{K_i^3} Y^2 + \dots = 0 \quad (8)$$

取展開項至Y一次方。

$$\ddot{Y} + \alpha \dot{Y} + \left(\beta + \frac{A}{K_i^2} \right) Y - \frac{A}{K_i} = 0 \quad (9)$$

其解為:

$$Y = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t} + Y_0 \quad (10)$$

其中為當 $t = 0$ 時, $Y = 0$; $\dot{Y} = 0$ 。

$$C_1 = \frac{Y_0(1 - \lambda_2)}{\lambda_1 - \lambda_2}; \quad C_2 = \frac{Y_0(1 - \lambda_1)}{\lambda_1 - \lambda_2};$$

$$Y_0 = \frac{A}{K_i \left(\beta + \frac{A}{K_i^2} \right)} \quad (11)$$

$$\lambda = \frac{-\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 - 4 \left(\beta + \frac{A}{K_i^2} \right)}}{2} \quad (12)$$

根據物理意義, 方程中所有常數都是正的實數, Y及X也只能取正實數值。那麼根 λ 可以是負的或者是復數(負實數部)。因此經擾動後, Y是以指數曲綫(如果 λ 為負)或以阻尼振盪的形式(如果 λ 為負數)趨向於定態 Y_0 。

在體外條件下, 酶的總濃度很低。那麼A的數值很小, 阻尼振盪式的反應不易觀察到, 如在體內局部酶濃度可能提高, 因此反應在局部區域形成振盪是可能的。特別生物體反應在開放系統內進行, 反應與其他作用偶聯, 不可逆性很强。作用1,2等反速度很小以至可以忽略不計時, 振盪式的反應出現的可能就更大。

當Y數值較大時, 上述的近似就不能認為合理, 因此進一步我們用級數方式求解: 設

$$Y = Y_0 + Y_1 e^{\lambda t} + Y_2 e^{2\lambda t} + Y_3 e^{3\lambda t} + \dots = \sum_{n=0}^{\infty} Y_n e^{n\lambda t} \quad (13)$$

同樣可以求得：

$$\lambda = \frac{-\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 - 4\beta \frac{Ki + 2Y_0}{Ki + Y_0}}}{2} \quad (14)$$

$$Y_0 = \frac{-Ki + Ki \sqrt{1 + \frac{4A}{Ki^2 \beta}}}{2} \quad (15)$$

這樣算得的解與以上用粗糙的近似所得結果具有相似的行爲。

肽的酶激活作用

崔桂芳 于富才 王德寶

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

在蛋白質生物合成過程中, 第一階段是氨基酸的激活, 這點已了解得相當清楚。生物體內是否有肽的激活作用, 至今只見 Tuboi 等在一篇短文中述及有些小肽在鴿肝 pH 5 酶與 ATP 存在時, 可以生成異脛氨酸鹽, 但對肽激活後的產物未作詳細鑒定。本文報導由酵母抽提出一個可使某些小肽爲 ATP 所激活的酶制劑, 以及對這種激活作用的性質與產物所進行的一些觀察。

酶制劑是根據 Van de Ven 等由酵母制備酪氨酸激活酶的方法, 略作修改而得到的。酶活力的測定用異脛氨酸鹽形成法。

用 18 種氨基酸 (甘、丙、纈、白、異白、絲、蘇、脯、酪、色、苯丙、精、組、賴、谷、門冬、甲硫、半胱) 進行實驗, 表明酶制劑只對酪氨酸有激活作用。在同樣條件下, 門冬酰胺也有反應, 而谷氨酰胺作用較弱。用 9 種小肽 (苄氧羰基苯丙氨酰酪氨酸, 苄氧羰基丙氨酰白氨酰酪氨酸, 苄氧羰基脯氨酰 N^{ϵ} -對甲苯磺酰賴氨酰丙氨酸, 苄氧羰基苯丙氨酰丙氨酰門冬酰胺, 脯氨酰酪氨酸, 苄氧羰基白氨酰纈氨酸, 苄氧羰基甘氨酰苯丙氨酸, 苯丙氨酰纈氨酸、甘氨酰甘氨酸) 作底物, 觀察到前 5 種小肽也有明顯反應。

由對小肽的反應可以看出: 帶有苄氧羰基或與對甲苯磺酰基保護基團的小肽可被激活; 而沒有這些基團的小肽也有反應, 所以異脛氨酸鹽的生成不是這些基團所引起的。以脯氨酰酪氨酸作底物進行實驗時, 在反應系統中取消了酶制劑或 ATP 的任一者, 都不能產生異脛氨酸鹽, 表明這反應是個需要 ATP 的酶促反應。小肽的羧基端不必是酪氨酸, 表示肽的激活與酪氨酸激活酶似無直接關係。

將用脯氨酰酪氨酸作底物所生成的酸溶性產物在 pH 4 進行紙電泳分離, 發現有一點向負極移動, 有紫外吸收, 並具有異脛氨酸鹽反應。此點洗脫液的紫外吸收高峯在 260 m μ , 其全光譜及光密度比值與脯氨酰酪氨酸: A-5'-P=1:1 混合物極相似。洗脫液加

鹼水解並濃縮後，再作紙電泳分離，可得到兩個點，分別與標準脯氨酰酪氨酸及 A-5'-P 的位置相對應。將洗脫液濃縮後，加酸水解，再作紙層析檢查，可得到與標準脯氨酸及酪氨酸相對應的點，經初步定量分析，脯氨酸與酪氨酸之比近於 1 (0.9:1)。

將二肽生成的酸溶性產物在 pH 5.6 進行紙電泳分離，則出現兩個紫外光吸收點，分別向正極及負極移動，其中向正極移動的一點並具有茚三酮反應，而已知激活的氨基酸由於其氨基酸部分與 A-5'-P 部分是酸酐形式的結合，在同樣 pH 下，能水解成 A-5'-P 與相應的氨基酸，因此推知肽與 A-5'-P 之間也是以酸酐鍵相連接的。由上述各種事實說明，和氨基酸一樣，肽也可以酶促激活。

如果酶制劑中混有肽酶，將含酪氨酸的小肽水解，產生自由的酪氨酸，這樣就會出現實際是由於酪氨酸激活酶所引起的假的肽激活現象。但是，這種可能性由以下實驗結果可以排除：

1) 不加 ATP，將酶與脯氨酰酪氨酸或苯氧羰基丙氨酰白氨酰酪氨酸保溫，然後用紙層析法檢查，結果在與對照酪氨酸相應的位置未能觀察到顯色點；

2) 在同樣實驗條件下，保溫 60 分鐘後，有反應的各肽所產生的異脛脲酸鹽都多於由等濃度酪氨酸所產生的。而用脯氨酰酪氨酸及酪氨酸分別作底物，各保溫 5、10 及 15 分鐘，結果在同一時間裏，二肽所產生的異脛脲酸鹽仍都比酪氨酸產生的為多；

3) 當酶量一定，加入的酪氨酸底物已達飽和時，再加入脯氨酰酪氨酸，則異脛脲酸鹽的生成量有進一步的增加，增加的趨勢與脯氨酰酪氨酸單獨作為底物時相仿；

4) 實驗進行中曾發現有些酶制劑對酪氨酸沒有反應，但却能激活脯氨酰酪氨酸；

5) 酶制劑可激活苯氧羰基脯氨酰 N^ε-對甲苯磺酰賴氨酰丙氨酸，而不激活丙氨酸。

此外，由 3) 及 4) 尚可推斷，肽與酪氨酸很可能不由同一個酶或一酶的另一作用中心所激活。

以上結果指出，酵母抽提液中存在有激活小肽的酶。這種肽激活酶的存在可能與核苷酸肽的生物合成有關。至於在蛋白質生物合成中，是否除氨基酸激活途徑之外，肽的激活也起一定作用，尚待進一步的研究。

(本工作所用各肽由鈕經義先生及多肽組同志供應，特此致謝)。

金屬離子與核酸的相互作用

李載平 呂新法

(中國科學院生物化學研究所，上海)

I. 鎂離子與核酸結合的光譜研究：

核酸中存在有微量的金屬離子；金屬離子的存在可能與核酸二級結構的穩定性有關，與核酸蛋白絡合物的形成有關，而且也可能與核酸大分子的特殊電磁性質有關。但是金屬離子與核酸的結合部位是否主要在磷酸基團抑制或同時結合鹼基，則爭論很多，不能統一。我們認為由於金屬離子的不同、核酸結構的不同、以及其他條件的差異，結合部位可

能有所區別。本文報導了鋅離子對 RNA 與 DNA 的紫外光譜的影響，表明鋅離子既可與磷酸基團結合也可與鹼基結合，而後者又與核酸的二級結構有關，即與氫鍵體系的完整有關。

取酵母核糖核酸 (RNA) 的 0.2 N NaCl 溶液，加入等體積 $ZnSO_4$ 溶液，隨 $[Zn^{++}]$ 的增高，260 $m\mu$ 的吸收值 (E_{260}) 逐漸下降，當 $[Zn^{++}]$ 的最終濃度為 0.05 M 時，降低值可達 20% 光譜形狀基本不變，當 $[Zn^{++}]$ 高達 1 M 時， E_{260} 又可上升達原值。由於 $ZnSO_4$ 為強酸弱鹼鹽，含 $ZnSO_4$ 達 1 M 的溶液的 pH 值可低達 4.9。但是 RNA 在濃 $ZnSO_4$ 中的 E_{260} 復升作用並非由於 pH 的影響。當 $[Zn^{++}]$ 維持在 0.05 M 時，同時加醋酸鈉緩衝液至 pH 4.8 E_{260} 仍維持在降低 20% 的水平不變。另一方面這也不簡單是硫酸鹽的效應，因為加 Na_2SO_4 達 1 M， E_{260} 也不變。 Zn^{++} 對 RNA E_{260} 的影響可解釋如下， Zn^{++} 與 RNA 的磷酸基團結合能力較強，在低 $[Zn^{++}]$ 時，首先與磷酸基團結合，減弱了 RNA 大分子的負電荷，鏈的伸展度下降，鹼基間下電子雲的相互作用加強，紫外低吸收效應加強；此後當 $[Zn^{++}]$ 增高，大量鹼基與 Zn^{++} 結合，而紫外低吸收效應減弱， E_{260} 回升。

取小牛胸腺脫氧核糖核酸 (DNA) 的 0.2 M NaCl 溶液，加入等體積 $ZnSO_4$ 溶液， E_{260} 受 $[Zn^{++}]$ 變化的影響很小，但 100°C 保溫 30 分鐘後，即出現類似於 RNA 的行為， E_{260} 可以因低濃度 Zn^{++} 的存在而下降，並在較高 $[Zn^{++}]$ 下再逐漸升高。DNA 加中性甲醛至最終濃度為 1% 100°C 保溫 20 分鐘，冷卻後加入 $ZnSO_4$ 。 E_{260} 只表現因 $[Zn^{++}]$ 之增高而下降，並不能回升。似乎當鹼基的 $-NH_2$ 基團與甲醛反應後，即失去與 Zn^{++} 結合的能力。

關於金屬離子可能與核酸鹼基結合的報導中，以 Hg^{++} 的實驗論據最為有力，我們向 RNA 溶液中加入 $HgCl_2$ 至最終濃度為 1.25×10^{-4} M，光譜高峯即由 259 $m\mu$ 移至 270 $m\mu$ 。若溶液中再加入 $ZnSO_4$ ，則可競爭性地抑制 Hg^{++} 與鹼基的結合；當 Zn^{++} 的最終濃度為 0.5 M 時，即可使 DNA 的光譜完全恢復，所需 Zn^{++} 的濃度恰與前述引起核酸紫外吸收復升所需的濃度在同一範圍。這個作用不是簡單的鹽效應，或負離子結合 Hg^{++} 的效應，因為等濃度的 Na_2SO_4 並不能更動原來高峯的位置。可見 Zn^{++} 也可與核酸的鹼基結合。

Zn^{++} 可以與多核苷酸鏈的磷酸基團結合，使大分子結構緊縮，同時亦可以與鹼基結合，使大分子結構趨於舒展。 Zn^{++} 對前者的親和力大於對後者的，因而對於氫鍵體系完整的 DNA，當磷酸基團先與 Zn^{++} 結合，二級結構更為穩定時， Zn^{++} 與鹼基的結合便比較困難。熱變性的 DNA 在 Zn^{++} 濃度較高時，即可與鹼基結合。下述對 Zn^{++} 與核酸結合沉澱的研究中也證明了這一點。根據核酸二級結構不同以及金屬離子對磷酸基團與鹼基親和力可能不同的看法而作出的這種解釋，對於說明金屬離子與核酸的結合作用可能具有一般性的意義。

II. 鋅離子對核酸的沉澱作用：

金屬離子可以與核酸特別是 RNA 結合沉澱，由於缺乏系統深入的研究，其作用機制至今不清。

本文報導了鋅離子與核酸結合沉澱的基本條件，證明了鋅離子與核酸結合沉澱的能力與核酸的構型、分子的大小有關，鹼基也可參與結合。

用 ZnSO_4 可以沉澱核酸，沉澱的產生受溶液的 pH 與 $[\text{Zn}^{++}]$ 的影響。在 $[\text{Zn}^{++}] = 0.25 \text{ M}$ 時，由於溶液 pH 的不同， Zn^{++} 對核酸的結合作用可以分為三個 pH 區段。在 $\text{pH} < 5.4$ 時 RNA 與 DNA 皆不能為 ZnSO_4 所沉澱，pH 為 5.4—6.4 時，酵母 RNA 和酵母可溶性核糖核酸 (s-RNA) 可以與 Zn^{++} 結合沉澱，而且沉澱量隨 pH 之增高而增加，當 $\text{pH} > 6.4$ 時開始出現 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 的凝膠狀沉澱，RNA 即可被全部吸附沉澱。小牛胸腺 DNA 則只能在 $\text{pH} > 6.4$ 時為 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 吸附沉澱，而不能與 Zn^{++} 結合沉澱。另一方面，維持 pH 在 5.7—6.2 的範圍，改變 $[\text{Zn}^{++}]$ ，則可以看到在 $[\text{Zn}^{++}]$ 為 0.1 M 時 RNA 的沉澱即達最高值，而 DNA 却在 $[\text{Zn}^{++}]$ 高達 1.5 M 時也不能為 Zn^{++} 所沉澱。

天然 DNA 之所以不能為 Zn^{++} 結合沉澱，由以下實驗說明關鍵主要在於其雙螺旋構型。

1. DNA 溶液加中性甲醛至最終濃度為 1%， 100°C 保溫 20 分鐘後，即可為 Zn^{++} 完全沉澱。僅加甲醛而不保溫則全無作用。

2. 將保溫與未保溫的 DNA-甲醛溶液按不同比例混合，加入 ZnSO_4 後，則曾經保溫的部分可被 Zn^{++} 定量的沉澱，而且將此沉澱的上清液加檸檬酸鈉，再 100°C 保溫，即出現甲醛反應所具有的紫外吸收增高的現象，這都證明不沉澱部分為仍具有雙螺旋結構的 DNA。

3. 曾經 100°C 保溫 20 分鐘的 DNA 也可與 Zn^{++} 結合沉澱，但要求 $[\text{Zn}^{++}]$ 較高。而由前述實驗證明，熱變性的 DNA 需要較高的 $[\text{Zn}^{++}]$ 才能破壞非特异性氫鍵而變為單鏈狀態。

DNA 溶液中加入 DNase 保溫不同時間後立即冰冷，直接加入 ZnSO_4 或先加甲醛 100°C 保溫後再加 ZnSO_4 。在前者的情況下經過一個短的潛伏期，酶解產物即可與 Zn^{++} 結合沉澱，這可能是反映了單鏈片段的出現。酶解時間稍長單鏈片段增多，沉澱量隨之增加。酶解時間再長，酶解產物片段變小，與 Zn^{++} 結合沉澱的能力又趨於降低。在後者的情況下，不同時間酶解產物加甲醛保溫後，應該得到一系列長短不同的單鏈多核苷酸。實驗結果表明多核苷酸鏈越短則與 Zn^{++} 結合沉澱的能力也就越低。另一方面比較這兩種條件下酶解產物與 Zn^{++} 結合沉澱的能力表明，鹼基經甲醛反應後，多核苷酸與 Zn^{++} 結合沉澱的能力即大為降低，似乎鹼基亦參與和 Zn^{++} 的結合。

用 RNA 進行鹼水解，不同時間的水解產物與 Zn^{++} 結合沉澱的能力也隨鏈的變短而降低。RNA 經甲醛反應後，鹼基被結合，則與 Zn^{++} 結合沉澱的能力也顯著下降。

由以上結果可見， Zn^{++} 與核酸結合沉澱的能力並不在於 RNA 或 DNA 的區別，而主要與核酸的二級結構有關。單鏈的 RNA 易為 Zn^{++} 結合沉澱；而具有雙螺旋構型的 DNA 則不能；s-RNA 在我們的實驗條件下具有單鏈 RNA 的性質，除了構型因素之外，多核苷酸鏈越長就越易沉澱。在與 Zn^{++} 結合沉澱的作用中似乎磷酸基團起着主要作用，而鹼基也參與結合，並影響着沉澱作用的強弱。不同金屬離子的作用可能有所差異，但可能循此途徑予以澄清。

$\text{Zn}(\text{OH})_2$ 凝膠可以定量地吸附 RNA、s-RNA 或 DNA，並且可以為稀 Na_2HPO_4 溶液洗脫。本文將報導利用 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 凝膠柱層析分離酵母 RNA 與 s-RNA 與小牛胸腺 DNA 的一些初步觀察結果。

金屬離子與核酸的相互作用

III. 銅離子與核酸結合作用的研究

景 沛*

(中國科學院生物化學研究所, 上海)

文獻中對 Cu^{++} 與核酸作用的結合部位與機制都沒有一致的認識。Zubay 與 Doty (1957) 認為 Cu^{++} 僅能使核酸側邊聚集, 而不與鹼基結合。Eisinger et al (1961) 也認為 Cu^{++} 的結合部位可能是處於核酸外圍的磷酸基團。另一些作者認為 Cu^{++} 可能為鹼基所結合, 但未能在核酸巨分子的實驗中得到直接的證明。

我們應用了紫外 (UV) 分光光度法與金屬絡合指示劑-紫尿酸銨的光譜滴定法, 對各種不同 TNA (小牛胸腺脫氧核糖核酸) 制劑進行了比較研究, 認為 Cu^{++} 既能結合磷酸基團, 也能結合鹼基, 其結合機制則在不同的樣品制劑、介質鹽濃度、以及 Cu^{++} 的作用濃度條件下而有所不同。

(一) UV 光譜變化是反映鹼基是否受到影響的一種指標。Zubay 與 Doty 曾因未觀察到 Cu^{++} 所引起的 TNA 光譜改變, 而認為 Cu^{++} 不與鹼基結合。我們在不同濃度 NaCl 的中性 TNA 溶液中 ($\text{TNA} = 4 \times 10^{-5} M$ -磷), 觀察 Cu^{++} 對 TNA 光譜的影響, 發現在實驗條件中除了 CuCl_2 的作用濃度, 介質的 NaCl 濃度也起着很大的決定作用。

當溶液中 $[\text{CuCl}_2] < 0.016 M$, 則 E_{259} (波長 $259 m\mu$ 時之光密度值) 有顯著的增加, 同時吸收高峯也移向長波。這應該是 Cu^{++} 結合了鹼基組成, 而使核酸雙螺旋結構中鹼基對間氫鍵系統遭到破壞的結果。但在 $[\text{NaCl}] > 0.016 M$ 時, 則雖在相同的 $[\text{CuCl}_2]$ 條件下也不導致 UV 吸收的增加, 這可能是由於介質中 NaCl 濃度較高時, 核酸雙螺旋結構緊縮, 氫鍵系統較為穩定, 因而對 Cu^{++} 的侵襲有一定程度的保護作用。這也解釋了 Zubay 與 Doty 在 $0.2 M$ NaCl 條件下所得到的負結果。

經 100°C 保溫 15' 的熱變性 TNA 樣品則表現不同, 在無 Cu^{++} 存在時, 其 UV 吸收已處於較高的水平, 增加 $[\text{NaCl}]$ 雖也能使 E_{259} 降低, 但即使在 $[\text{NaCl}]$ 達到 $0.1 M$ 時, 一經加入低濃度的 CuCl_2 , E_{259} 即已開始在此基礎上繼續增加, 直到 $[\text{CuCl}_2] > 8 \times 10^{-5} M$ 才逐漸趨向平衡。這說明在雙螺旋結構遭受了熱物性嚴重破壞之後, 鹼基就更容易為 Cu^{++} 所作用, 而 NaCl 的保護作用則很不顯著。

(二) 紫尿酸銨 (Murexide) 的游離型之最大吸收高峯在 $525 m\mu$ 結合 Cu^{++} 後則移至 $478 m\mu$ 。

以 $\alpha = \frac{\text{加入 } \text{Cu}^{++} \text{ 後的 } E_{525}/E_{478}}{\text{未加 } \text{Cu}^{++} \text{ 前的 } E_{525}/E_{478}}$ 表示紫尿酸銨結合 Cu^{++} 後剩餘的游離型的分

數, 當溶液中加入的 $[\text{Cu}^{++}]$ 增加時, α 則迅速隨之下降。在有 TNA 樣品存在時, 部分 Cu^{++} 為核酸所結合, 就會觀察到此 α 的下降受到抑制。藉此可以比較不同的樣品對 Cu^{++}

* 本工作在張友端先生指導下進行。



的結合能力。

實驗結果，從較低的 $[\text{CuCl}_2]$ ($1 \times 10^{-5} M$) 開始，天然 TNA 就與 Cu^{++} 有一定的結合。TNA 經過 90°C , 30' 熱變性後，結合能力有所降低，而經過 5% 三氯醋酸 90°C , 30' 水解後的樣品，其結合能力的減弱則更為顯著。染料滴定法所反映的 TNA 與 Cu^{++} 的結合雖不能分辨具體結合部位，但上述實驗結果指出磷酸基團應該是主要的。因為就天然 TNA 而言，前述 UV 觀察已說明在本實驗所用鹽濃度較高而 CuCl_2 濃度較低的條件下， Cu^{++} 不與鹼基結合，至於變性及降解的 TNA，由於核酸二級結構遭到破壞，其磷酸基團結合反離子的能力大為降低，因而即使此時鹼基已有可能結合 Cu^{++} ，總的結合量還是低於天然 TNA 的。

Shack 與 Bynum (1959) 用鉻黑 T 染料為指示劑，測定核酸樣品對 Mg^{++} 的結合能力，也曾得到變性 TNA 結合 Mg^{++} 能力較弱的相似結果。

值得注意的是，在上述實驗條件下，當溶液中 $[\text{CuCl}_2]$ 繼續增加時，變性樣品的結合量與天然樣品漸趨一致並且超過了它。這可能正是磷酸基團被 Cu^{++} 飽和後， Cu^{++} 繼續與鹼基結合時，變性樣品結合能力強於天然樣品的表現。至於 TNA 的無嘔呤制劑，在整個滴定過程中，始終未能觀察到明顯的結合行為。這可能是由於它的二級結構已嚴重破壞，同時鹼基組成中結合 Cu^{++} 能力較強的嘔呤鹼被大量除去，以致於磷酸基團與鹼基的結合能力全部下降的結果。

以上結果說明 Cu^{++} 與 DNA 的結合基本上與 Zn^{++} 相似，磷酸基團及鹼基兩者都能被結合，而且都受核酸二級結構的影響。在我們的實驗條件下，天然 DNA 的磷酸基團與 Cu^{++} 較易結合，而鹼基的結合則要求較高的 $[\text{Cu}^{++}]$ 及某些減低氫鍵穩定性的條件。

(本工作進行中承李載平同志關心並提出寶貴意見特此致謝)

1963.3.15
C280994
4.00 (4) (7)

6316167 58.173

6316167 58.173
178

生物化学研究论文(摘要)

梁生初 1963.5.23. 2 5.

吴哲华 1972.11.20.

3.18.13.14日

83.11.24

58.173
178

6316167

注 意

- 1. 借书到期请即归还。
- 2. 请勿在书上批改圈点、折角。
- 3. 借去图书如有污损遗失等情形须照价赔偿。



1-5