

表3 不同量的胰蛋白酶对氨肽酶M释放的影响

编号	名称	胰蛋白酶量 (毫克)	酶活力 单位/毫克蛋白
1		15	4.7
2		30	3.9
3		50	6.3
4		75	5.4
5		100	8.4

试验条件: 1. 保温1小时; 2. 每个样品为50毫升微粒体, 以0.2M, pH7.4 Tris-HCl缓冲液稀释至最终体积为70毫升; 3. 悬浮液内温度为37—40℃

说明: 从表中看出随着胰蛋白酶用量的增加, 酶活力的释放也增加。因胰蛋白酶较贵, 为降低成本, 我们选用[编号3] 50毫克胰蛋白酶/70毫升的条件(即0.7毫克/毫升)。这和文献所述0.64毫克/毫升条件相近。

(2) Visking 20/32 透析袋透析去盐, 代替Sephadex G-50 柱层析法去盐。透析时产生的杂质沉淀可离心去除, 使中间产品再一次纯化。(见表2)

(3) 国产 DEAE 纤维素分级层析代替 DEAE-Sephadex A-50 梯度层析, 操作简便, 主要活力峰集中(图1)。活性部分以过饱和硫酸铵反透析缩短了浓缩过程, 可防止一般浓缩方法(如以电风扇吹干透析袋中的样品溶液)。易

长霉的弊病。经50—80% 硫酸铵分级后, 酶回收率占处理前酶活力62%。

我们将猪肾投料量增至9公斤, 使用DEAE-纤维素大柱(6×110厘米)也获得成功, 产量超过50毫克/公斤猪肾, 最高可得66毫克/公斤猪肾以上。

本文介绍的氨肽酶M制法具有方法简便, 生产流程短, 得率高, 成本低, 节省人工等优点。

工作中曾得到本所曹天钦、戚正武、谭佩辛、鲁子贤、屈贤铭、陆应钰的指导; 黄中祥、葛根发参加部分工作, 蒋传炎参加产品分析鉴定, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Delange, R. J. et al.: *The Enzymes* (Ed. Boyer, P. D.), Vol. 3, New York and London, Academic Press, 101, 1971.
- [2] *PRC-FRG, Joint Symposium on Nucleic Acid and Proteins* (Peptide, Synthesis Group) Abstracts, Shanghai, 49, 1979.
- [3] 张先扬等: 《生物化学与生物物理学报》, 1978年, 4期 309页.
- [4] Peleleiderer, G.: *Methods in Enzymology* (Ed. Perlman, G. E. et al.), Vol. 13, New York and London, Academic, Press, 514, 1970.
- [5] Green, M. N.: *Arch. Biochem. Biophysics*, 57, 458, 1955.
- [6] 潘家秀等: 《蛋白质化学技术》, 科学出版社, 1962年.

[本文于1980年3月24日收到]

乙基氯汞-胰岛素衍生物 1.5Å 分辨率强度分析

赵宝光 毕汝昌

(中国科学院生物物理研究所)

在蛋白质晶体学中, 一般用实验的同晶置换法获得中等分辨率的蛋白质晶体结构, 然后用数学方法, 即结构修正方法进一步提高分辨率^[1]。目前, 用同晶置换法获得的蛋白质结构的最高极限分辨率约为1.8Å。这就是我国胰岛素晶体结构分析所达到的水平^[2,3]。为了探讨进一步提高此法所得结果的分辨率的可能性, 我们对乙基氯汞-胰岛素衍生物1.9Å—1.5Å壳层强度数据进行了分析。

乙基氯汞-胰岛素是一个质量很好的重原子衍生物, 在三方二锌猪胰岛素1.8Å分辨率结构分析中起着首要的作用。我们用普通的R3晶体、按原来的浸泡条件^[4]制备了乙基氯汞-胰岛素衍生物。在PW1100四圆衍射仪上, 用CuKα辐射和一般条件($\omega/2\theta$ 扫描, 峰宽1.32°, 步长0.267°, 速度0.04°/秒)收集了1.9Å—1.5Å壳层的hKi0反射。用胰岛素晶体和衍生物晶体分别测得了854和834个强度数据。其中

大于标准偏差 σ 的反射分别占总反射数的40%和56%,其中有相当数量的反射,它们由对称性相关的衍射强度是相接近的。经 pI 因子校正、六个等效强度平均,和衍射指标对齐,获得了母体和衍生物的独立强度数据,分别有155个。使用加和平均可使观测数据的 σ 降低 $\sqrt{6}$ 倍,因而大于 2σ 的反射可达50%以上。基于 Wi/Son 统计原理对两套数据进行了统一。用这样处理得到的数据计算了同晶差值帕特逊投影(图1)。

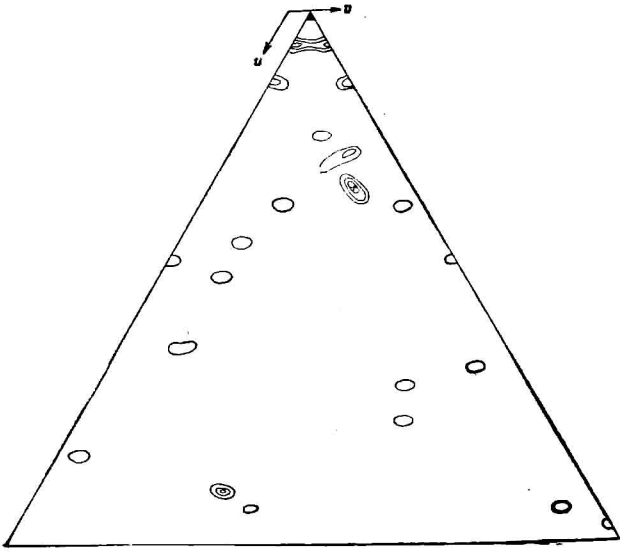


图1 1.9Å—1.5Å 同晶差值帕特逊投影

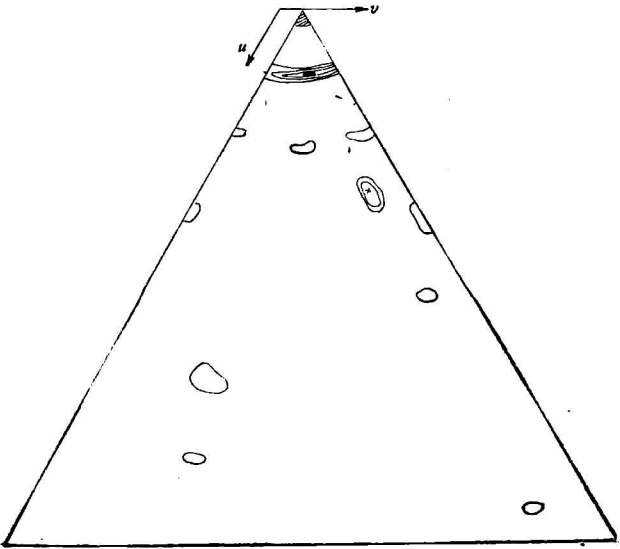


图2 3.5Å—2.5Å 同晶差值帕特逊投影

从图1可以看出,尽管图的质量较差,但除了挖心效应造成的环状峰外,预定位置上的重原子向量峰(图中用 $\times$ 标记)是全图最高的峰。如果将数据中误差较大的强度数据去掉,计算结果表明,图1中的次重峰的相对高度会显著下降。

在我们的计算里,傅里叶级数加和不包括分辨率低于1.9Å的项。这种挖心可以造成类似于级数断尾效应的影响。我们用过去使用的3.5Å—2.5Å壳层数据计算了该投影图(图2),围绕原点峰也出现了环状峰,但在不用挖心的2.5Å分辨率数据算得的图上,这样的峰则完全消失了,而且重原子向量峰是唯一的高峰,背景极低。

在蛋白质晶体学中,差值帕特逊函数被用来测定重原子的位置,同时能对重原子衍生物的质量做出初步的判断。用这种方法正确测定的重原子参数经最小二乘法修正,就可被用于确定蛋白质周相。然而,用1.9Å—1.5Å这样高分辨率壳层数据做帕特逊投影分析还是第一次尝试。值得注意的是重原子向量峰在图上有清楚的表现。对于乙基氯汞-胰岛素衍生物,我们相信,如果采用更好的晶体和其他条件收集1.9Å—1.5Å壳层数据,则能够算得质量较好的三维帕特逊图,重原子向量峰将会表现得相当突出。从上述试验可以得到初步的结论:当合适的重原子化合物与蛋白质结合良好时,重原子对晶体破坏极小,在1.8Å以上的分辨率重原子衍生物晶体与蛋白质母晶体也能保持良好的同晶型,这种情况下,重原子引起的衍射强度差异可被用来测定蛋白质的固相。因此,有可能用实验方法而不是用结构修正的方法获得优于1.8Å分辨的蛋白质电子密度图。这样做将能够提供一些可靠的结构信息,并能对结构修正方法的效果进行考察。

本工作所用的强度数据是在吴伯木和窦

士奇两同志的大力支持下收集的,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Blundell, T. L. and Johnson, L. N.: *Protein Crystallography*, p. 420, Academic Press, 1976.
[2] Blundell, T. L.: *Adv. Protein Chem.*, 26, 279,

1972.

- [3] 北京胰岛素结构研究组:《中国科学》, 1974年, 6期 591页。
[4] 胰岛素结构研究组:《中国科学》(试刊), 1972年, 1期, 1页。

[本文于1980年4月9日收到]

蛙视杆细胞外段盘膜内视紫红质分子的侧向扩散检测

胡坤生 马万禄 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所)

赵 东 坡

(山东省中医药研究所)

脊椎动物视杆光感受器分外段和内段(图1);在外段中,大约90—95%的膜区是由许多独立的盘膜堆积成的。因种类不同,盘膜数约为500—2000个。盘膜的化学组分中类脂大约占视杆外段干重的40%,蛋白质占60%,而其中80%的蛋白质为视紫红质。蛙视杆外段长约50微米,直径6—7微米,其精细结构已有详细的综述^[1]。

根据生物膜结构的流动镶嵌模型,生物膜的基本结构是功能蛋白质分子浮动镶嵌于类脂双分子层中^[2]。具有双亲性基团(亲水基和疏

水基)的类脂分子在水解质中由于其结构特性可形成有序的溶致近晶相液晶,因此视紫红质分子在盘膜的类脂双层中可进行旋转扩散和侧向扩散运动。

膜内类脂和蛋白分子运动,曾用多种方法测定。如 R. A. Cone (1972) 和 P. K. Brown (1972), 用高速闪光光度法测定了视紫红质在蛙视杆外段盘膜里的旋转扩散^[3,4]; H. Trauble (1972) 和 P. Devaux (1972) 用自旋标记脂探针测到一些人造膜和天然膜的侧向扩散系数为 $1-6 \times 10^{-8}$ 厘米²/秒; L. D. Frye (1970) 和 M. Edidin (1973) 用荧光标记测得膜中蛋白的侧向扩散为 $5 \times 10^{-11}-2 \times 10^{-9}$ 厘米²/秒;还有人用显微分光光度术测量了蛙和大鲵鱼(mudpuppy)视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散,在20℃时,其扩散系数为 10^{-9} 厘米²/秒数量级^[3,4]。

我们用显微分光光度法测定了室温下和47—48℃温度处理后视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散,并考察蛙离体眼球经温度处理后的早期感受器电位的R₂峰值在47℃达到最大值的原因^[5]。现将结果,介绍如下:

材 料 和 方 法

实验材料为北京产黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*)

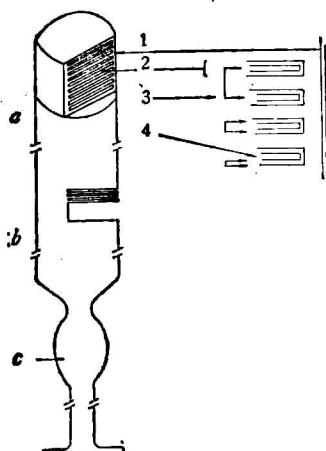


图1 脊椎动物视杆细胞模式图

a. 外段 b. 内段 c. 核部

1. 原生质膜 2. 盘膜 3. 细胞质空间 4. 盘腔