

$n(X^2)_n = \Sigma x^2/n$ 即分别是 x , y , xy 及 x^2 的平均值, n 为测量次数, 电线性回归可求出 $a(E'')$ 及 $b(S)$ 的最佳值, 用小型机或某些计算器均可解算。

目前, 在临床化学及生理学研究中使用 ISE 较准确的方法是多次添加法。此法的依据是

$$E = E'' + S \log \frac{c_x V_x + \sum_i c_i V_i}{V_x + \sum_i V_i}$$

可先设 $c_x = 0$, 然后在添加次数 $i = 2, 3 \dots$ 时解方程中的 S 及 E'' 的初始值, 再借此初始值代入方程求出 c_x 的估算值, 重复此运算至 S 、 c_x 收敛时为止。近来我国已有人用小型台式机按此法测定了血钙以尿中 NO_3^- 的含量。

结 语

Frike 曾预言, 离子选择性电极未来发展的主要动力将来源于医学和生物学。从最近文献及有关国际会议所反映的情况看来, ISE 在生理学和医学研究中的应用在稳步发展。而且可

以预见, 随着探测细胞及亚细胞级 ISE 技术的出现, 将有力地推动生理学和医学的研究。

参 考 文 献

- [1] Meyerhoff, M. E. et al.: *Anal. Chem.*, **54**, 27, R, 1982.
- [2] Frike, G. H.: *Anal. Chem.*, **52**, 259 R, 1980.
- [3] Koryta, J.: *Anal. Chim. Acta*, **111**, 1, 1980.
- [4] 苏渝生, 《分析仪器》, 1982 年, 1 期 74 页。
- [5] 章咏华, 《离子选择性电极通讯》, 1982 年 2 期 22 页。
- [6] IUPAC: *Pure and Appl. Chem.*, **53**, 1907, 1981.
- [7] Thomas, R. C.: *Ion-Selective Intracellular Microelectrodes*, Academic Press, 1978.
- [8] D. M. Band et al.: *Ion-Selective Electrode Methodology*. Vol. 2, Ed. by Convington, A. K., CRC Press, Inc., 1979.
- [9] 藤本守等: 《综合临床》, **29**, 2699, 1980.
- [10] Galiulina, D. V. et al.: *Lab. Delo.*, 332, 1980.
- [11] R. A. 德斯特主编(殷晋尧等译): 《离子选择性电极》, 科学出版社, 1976 年。
- [12] Covington, A. K. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **78**, 219, 1975.
- [13] Solsky, R. L. et al.: *Science*, **204**, 1308, 1979.
- [14] Haemnevli, A. et al.: *Anal. Chem.*, **52**, 1179, 1980.
- [15] Kylys, J. J.: *Anal. Lett.*, **14**, 377, 1981.

[本文于 1982 年 7 月 8 日收到]

X 光光谱在生物分子研究中的应用

王 其 武

(中国科学技术大学化学系, 合肥)

一、引 言

同步辐射加速器是一个新型光源, 其发射的 X 光具有波长连续可调、强度大、准直性好等独特的优点^[1]。用于生物分子学的研究中, 不仅能够检测微量化学元素的种类, 而且可以研究在生物大分子中该种原子的局部环境结构及其化学特性^[2]。特别是对一些金属原子, 如 Fe、Cu、Mo 等更有意义, 因为它们往往在生物化学过程中起决定作用。研究它们的周围环境, 键合状态及其与生物过程的关系, 正是分子生物学的重要课题。

X 光光谱与 X 光衍射不同, 它以 X 光的吸收系数或荧光产率作为 X 波光长的函数, 它反映个别原子的局部结构, 只依赖几个 Å 之内的有序结构, 因此对生物大分子来说, 它是进行局部解剖的有力工具。

X 光光谱学包括元素吸收边结构的研究和延伸 X 光吸收精细结构两大部分 (图 1)。

1. 吸收边结构的研究 K-边为原子的 K 层电子被打出时所吸收的能量, 其数值决定于原子序数本身。生物大分子中不同元素 K 边位置相差甚远, 可以分别研究而互不干扰, 如 FeK 边在 7112 eV, 而 MoK 边为 19,999 eV。吸收

边区(包括边前区)的精确位置、形状、特征反映元素的氧化态、中心对称性及其电子结构,因此可以用以研究同一元素在具有不同生物特性时,这些性质的变化,以便了解其微观动态性质。

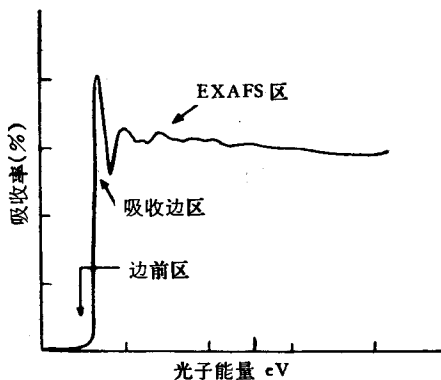


图 1 X 光吸收光谱区域

2. 延伸 X 光吸收精细结构 (EXAFS)

EXAFS 是由于发射出来的光电子受到原子周围其它原子的反射而与发射光电子相干涉而产生的。它的形状、强度决定于周围原子的种类、配位数,与中心原子的距离及其波动。原子间距离的精确度可达到 $0.02 \text{ \AA}$, 配位数误差约 20%。例如,可以测得细胞色素氧化酶在氧化态时,铜原子周围有氮原子两个,距离 $1.97 \text{ \AA}$, 硫原子两个,一个距离铜 $2.18 \text{ \AA}$, 另一个为 $2.82 \text{ \AA}$ 。

X 光光谱测定的其它优点是:可用于晶体、非晶态、冷冻样品、溶液。用荧光法可以测定稀溶液,这对于生物分子的研究是很方便的;X 光光谱原则上可用于任何元素,没有顺磁、穆斯堡尔,同位素等方法所有的元素局限性,X 光光谱由于用强的光源,实验结果可以在几分钟或几小时内得到,其数据分析可以在几天或周内完成,比晶体研究要快得多。

自从同步辐射光源出现以来, X 光光谱重新引起生物化学家、生物物理学家的注意。近年来,在一些生物分子的结构研究上已取得了良好的结果。我们的第一个同步辐射光源也正在合肥建设^[3], 不久的将来,我国生物化学家、

生物物理学家也可在研究中运用这一先进工具。

二、X 光光谱测定的实验装置

实验装置示于图 2。

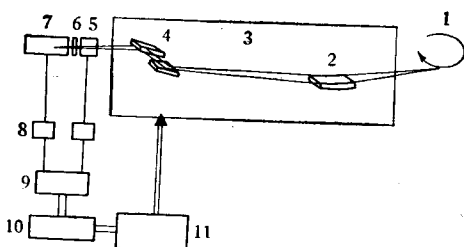


图 2 X 光光谱实验装置图

由电子储存环 1 出来的 X 光进入氦气氛光学系统 3, 经弯曲镜 2 聚焦, 双晶体单色仪 4 单色化, 入射到样品 6 上。先由电离室 5 测定入射光强度 $I_0(\lambda)$, 经过样品后, 由电离室或荧光检测器 7, 测定透射强度 $I(\lambda)$ 或荧光强度 $F(\lambda)$ 。样品前后的光强度经前置放大器 8 放大后, 到达多道计数器 9。整个系统工作由电子计算机 10 控制, 同步马达 11 控制单色仪调整 X 光波长。

三、生物分子的 EXAFS 研究

1. EXAFS 基本原理^[4]

能量 E 大于吸收边能量 E_0 的 X 光被中心原子吸收, 发射出光电子, 此电子受到中心原子周围的原子反散射形成另一电子波, 与出来的波相干涉, 产生正弦形式的吸收。EXAFS 函数, $X(K) = [\mu(K) - \mu_0(K)]/\mu_0(K)$, 它与其周围第 i 层原子的配位数 N_i , i 层原子与中心原子的距离 r_i , 及由两种原子决定的相移 $\delta_i(K)$ 和振幅函数 $f_i(K, \pi)$ 的关系式如下:

$$X(K) = -\frac{1}{k} \sum_i \frac{N_i}{r_i^2} \exp\left(-\frac{2r_i}{\lambda}\right) \cdot f_i(K, \pi) \cdot \exp(-2\sigma_i^2 K^2) \sin[2Kr_i + 2\delta_i(K)]$$

其中 $K = \frac{1}{h} [2m(E - E_0)]^{1/2}$ 为能量为 E 的 X 光入射产生的光电子的波矢, E_0 为中心原子

的 K 吸收边能量。求和遍及各配位壳层 j 。此式经过傅立叶变换可以化为原子间距离的函数。

对于生物分子，最近配位壳与次近配位壳的 EXAFS 函数常常重叠；有时一个配位壳上有两种原子，情况较为复杂。现以第一种情况为例，示于图 3 中：

金属 M 有一个 N 配位壳，一个 S 配位壳 (3a)。 N 和 S 各自贡献一个正弦 EXAFS 分量 (3b)，合成总的 EXAFS 谱 (3c)。 $M-N$ 和 $m-s$ 波各有一套参数决定自己 EXAFS 分量的相移和振幅等。

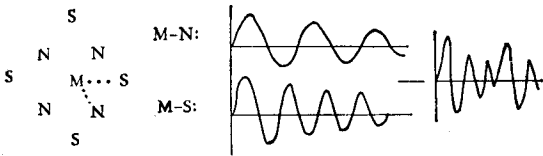


图 3 具有两种配位壳金属络合物的 EXAFS 谱

$$\begin{aligned} \text{EXAFS}(M-N) &= -\frac{N_N}{k r_N^2} \exp\left(-\frac{2r_N}{\lambda}\right) \\ &\cdot f_N(K, \pi) \exp(-2\sigma_N^2 K^2) \\ &\sin[2K r_N + 2\delta_N(K)] \\ \text{EXAFS}(M-S) &= -\frac{N_S}{k r_S^2} \exp\left(-\frac{2r_S}{\lambda}\right) \\ &\cdot f_S(K, \pi) \cdot \exp(-2\sigma_S^2 K^2) \\ &\sin[2K r_S + 2\delta_S(K)] \end{aligned}$$

经调整式中各结构依赖参数 N 、 r 、 f 、 δ 和 σ ，可使所拟曲线与实验曲线相符合，从而得到合理的结构参数。此种非线性最小二乘法的曲线拟合，与傅立叶变换结合起来，证明是对生物分子体系最实用的数据分析方法^[5,6]。

2. 一些研究结果

(1) 血红蛋白的研究 以 k 和 R 为横坐标的血红蛋白的 EXAFS 谱示于图 4 中，类似的脱氧血红蛋白的 X 光吸收光谱也得到了。获得这些光谱使用荧光光谱仪，照射 20 分钟，总 X 光通量为 10^{13} 个光子，血红蛋白样品为 24 mM 血红素的溶液，体积 0.15 毫升，含铁原子约 2×10^{18} 个。

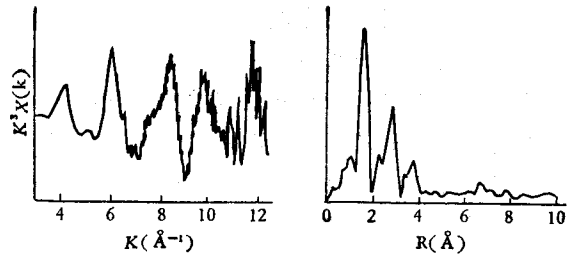


图 4 氧化血红蛋白 EXAFS 谱
乘以 K^3 转换到 K 空间，和经傅立叶变换到 R 空间

开始只是得到一些定性的资料^[7]，近来获得了氧化血红蛋白 (HbO_2) 和脱氧血红蛋白 (Hb) 中 $Fe-N_p$ (卟啉氮) 键长的数据，精确到 0.01 $\text{\AA}$ ^[8]。由于能够测定铁与其配位体之间的精确距离，使我们对血红蛋白作用的细节有了肯定的了解，使多年来争论的问题得以澄清。

首先，测得的 $Fe-N_p$ 距离，在两种血红蛋白中是一样的。不像一般离子型化合物中，由高铁到低铁，铁与配位体间键长增加 0.12 $\text{\AA}$ 。这是由于当电子加到有像血红素这样具延伸 π -键的络合物上时，电子是加到配位体上，而不是加到铁离子上。整个络合物被还原了，但铁的价态不变，因而 $Fe-N_p$ 键长也不变。

其次，EXAFS 谱测定的 $Fe-N_p$ 键长，在 Hb 中表明铁在血红素平面上仅仅 0.2 $\text{\AA}$ 左右，这与五配位铁卟啉的 X 光研究是一致的，说明卟啉环有所松弛，铁并未因长的 $Fe-N_p$ 键而被逐出平面。铁的位置是由轴向配位体的空间障碍造成的。

第三，由于 Hb 和 PF 中， $Fe-N_p$ 距离是一样的，因此并没有因球蛋白而引起 $Fe-N_p$ 键收缩；同时，在高低氧亲合力的脱氧血红蛋白中也有同样的 $Fe-N_p$ 距离，因而也没有四方结构变化引起的收缩。文献上关于球蛋白引起 $Fe-N_p$ 键收缩的说法，在这里未得到实验支持。

(2) 固氮酶的研究 在固氮酶钼铁蛋白中，每 220,000 分子量中含有两个钼原子，含有铁和酸性易变硫各 24—32 个。尽管有很多关于钼是氮还原中心的假定，但在用同步辐射进行 X 光光谱测定之前，没有办法来观察蛋白中钼的状态，只有近来吸收边和 EXAFS 的研究，

才提供了固氮酶中钼环境的信息^[9,10]。

冻干巴斯德固氮梭状芽胞杆菌的 MoFe 蛋白 X 光吸收谱显示了清晰的节拍。参照模型化合物的 X 光光谱, 可以知道围绕钼至少有两个配位壳。EXAFS 谱的仔细曲线拟合鉴定出低频部分是离 Mo 2.35 Å 远的硫壳层, 这一波形的相移与 Mo-S 配位相移一致, 而波振幅表明有四个硫原子。第二个结论是半还原状态时, 没有 Mo-O 键存在。这一结果是基于吸收边的位置和形状, 及在 EXAFS 中不存在更低频率分量; 如有较短的钼氧键存在, 应有这种低频分量。第二个散射原子壳在离钼 2.72 Å 的地方。这一配位壳起初以为是 Mo 本身, 但与 Mo-Mo, Mo-S 的相移参数相去甚远, 而与 Mo-Fe 较为接近, 由分析指出在 2.72 Å 处有 2—3 个铁原子。最后为获得完全一致的拟合, 还需要考虑另一个配位壳, 这是在 2.47 Å 处的 1—2 个硫原子。由此提出了两个新的 MoFeS 原子簇模型。如图 5 所示。

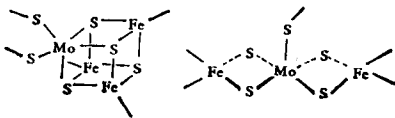


图 5 固氮酶中两种可能的 Mo-Fe 键合结构

实验所测配位数和原子间距在化学上是合理的, 通过与已知结构比较表明围绕钼有 3—4 个桥式硫, 1—2 个端基 RS⁻ 及 2—3 个通过硫桥连接的铁原子。

固氮酶中存在 MoFeS 原子簇, 这就提出了

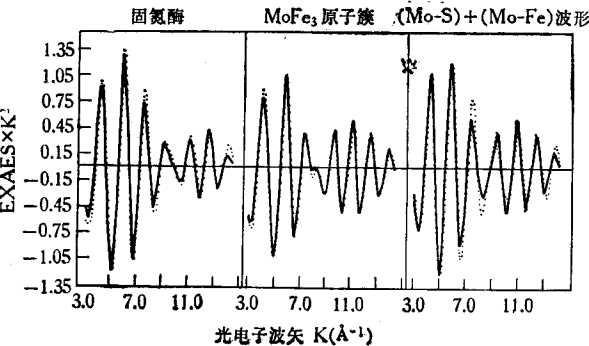


图 6 固氮酶及 MoFe 原子簇的曲线符合分析
右图为拟合结果的比较: ——原子簇 ----固氮酶

合成类似无机化合物的设想。近来, 这种络合物 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_9(\text{SEt})_8]^{3-}$ 已被分离出来, 并作了结构鉴定。含有两个立方的 $\text{Mo}_2\text{Fe}_3\text{S}_4$ 二聚体。它的 EXAFS 与固氮酶中钼的 EXAFS 比较示于图 6 中。可以看出两个谱十分相似, 特别是 EXAFS 的相位更为一致, 只在 $k = 9 \text{ Å}^{-1}$ 左右, 有一点差别。曲线符合分析表明 Mo-S, Mo-Fe 间的关系, 在固氮酶和合成原子簇中本质上是一样的。模型化合物与蛋白质之间的差别主要在外配位体, 当然从整体来说模型化合物并不与蛋白相似。

(3) 黄嘌呤氧化酶与亚硫酸盐氧化酶的研究 黄嘌呤氧化酶是一种含钼的酶, 由两个约 150,000 分子量的亚基组成, 每个亚基含一个钼、两个 $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4$ 原子簇和一个黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。在钼中心上氧化黄嘌呤为尿酸, 在 FAD 上还原 O_2 为 H_2O 。近二十多年来, 黄嘌呤氧化酶是广泛研究的课题。现在它是生物上了解比较清楚的酶之一。电子自旋共振和光谱分析已阐明了它与各种底物反应的动力学和机理。这些方法也有助于了解它的化学还原和天然酶的非活性状态。但是, 对静态活性酶和非活性酶的钼中心结构, 还是不知道的。只有近来用 EXAFS 谱才提供了氧化态酶中钼环境的描述^[11]。

亚硫酸盐氧化酶催化氧化亚硫酸盐为硫酸盐。这种酶每个亚基含有一个钼、一个血红素, 以水为氧的来源。已用曲线拟合方法分析了氧化态黄嘌呤氧化酶的 EXAFS 谱^[12]。EXAFS 谱的包线上有节拍存在, 证明至少有两种不同的 Mo-L (配位体) 距离。亚硫酸盐有同样的情况。这些酶中含有 MoO_4^{2-} 结构单元^[12]。

这两种蛋白中, 平均 Mo-O 距离相同, 都是 1.71 Å, 但 Mo-S 距离不同, 亚硫酸盐氧化酶为 2.42 Å, 而黄嘌呤氧化酶为 2.54 Å, 这些距离上各有两个硫原子。在更远处, 都存在另一个硫原子, 于 2.85 Å 处。这两种酶 EXAFS 的相似表明至少 Mo 的五个配位体是相同的, 而且在相近的距离上。

最近合成了两种含有三种配位体的模型化合物,并作了 EXAFS 谱分析^[13],与黄嘌呤氧化酶和亚硫酸盐氧化酶进行了比较(图 7)。尽管两种化合物基本结构相同,但在 k 为 $6.5\text{--}8.5\text{ \AA}^{-1}$ 的区域内,节拍有明显的差别。这说明了 EXAFS 方法能够区别金属配位壳中一个配位体不同,即由 $-\text{SCH}_3$ 换为 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$,在 EXAFS 上有明显的差别。由图 7 可以看到含有 $-\text{SCH}_3$ 的模型化合物的 EXAFS 与静态亚硫酸盐氧化酶的 EXAFS 可以重合起来,这说明其 Mo 环境是基本相同的。

由这些结果提出了静态黄嘌呤和亚硫酸盐氧化酶的结构模型。约 $1.7\text{ \AA}$ 处的氧为末端氧而不是桥式氧,与钼络合物中的末端氧相似。中间的硫类似于硫代酸盐的硫钼距离。但在黄嘌呤氧化酶中比亚硫酸盐氧化酶中稍长约 $0.1\text{ \AA}$,这些硫对 Mo-O 基团可能为反式结构。在这些酶中,最远的一个硫可能是硫醚式结构,也可能是过硫化合物的第二个硫。由 EXAFS 还鉴定出由于被还原,亚硫酸盐氧化酶失去了一个末端氧。

(4) 细胞色素氧化酶的研究 其 EXAFS 情况较为复杂^[14]。这种酶中含有铜铁两种中心,铁的 EXAFS 又是由两种不同的铁中心合成的,铁的 EXAFS 也是由两种不同的铁中心构成的。因此,必须由不同的模型化合物分别

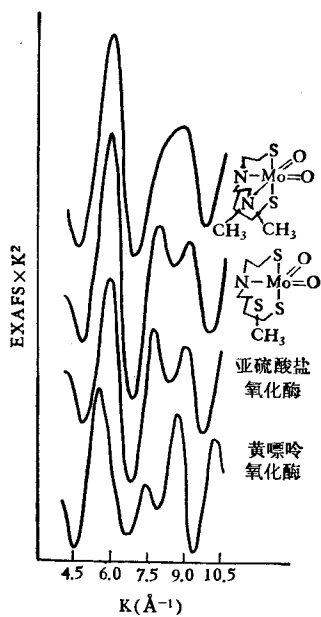


图 7 黄嘌呤、亚硫酸盐氧化酶及模型化合物的 EXAFS

模拟不同的铜中心和铁中心。由 EXAFS 得到的配位和键长结果,示于图 8 中。Cua₃ 的第一配位壳,在氧化和还原时均类似于星蓝蛋白,而 Cua 的配位有通常的 Cu-S 和 Cu-N 或 Cu-O 距离,配位数为三个或二个 S,一或二个 N 或者 O, Cua 的高硫配位数与它比 Cua₃ 显示高的共价性是一致的。铁的第一配位壳比较简单, Fca₃ 类似于血红蛋白,但在氧化态和混合甲酸盐价态时,轴向配位为硫,在被 CO 还原和混合 CO

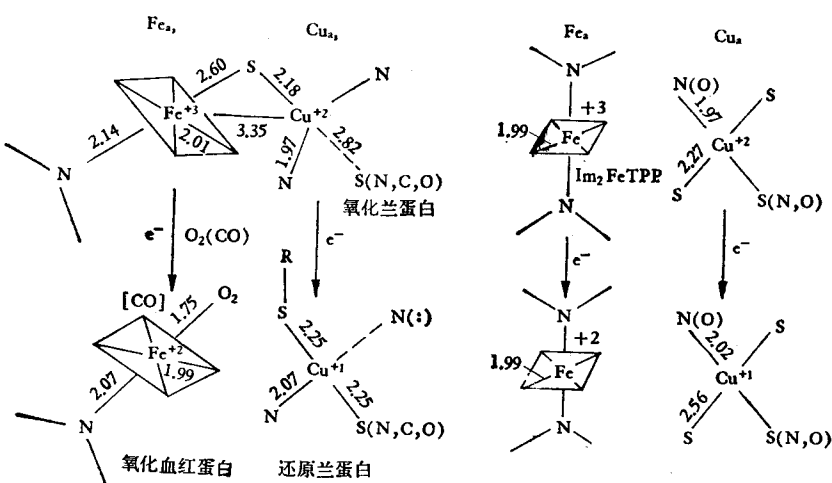


图 8 细胞色素氧化酶氧化态及一氧化碳还原态的氧化还原中心

价态时,这个硫为 CO 所代替。在 Fea 中,类似于 Im_2FeTpp , 氧化还原时变化不大。由图可知 $\text{Fea}_3\text{-Cu}_2\text{a}_3$, $\text{Fea}_3\text{-S}$ 和 $\text{Cu}_2\text{a}_3\text{-S}$ 距离,故可计算桥硫键角为 103° , 这对于 sp^3 杂化的硫,也是合理的。

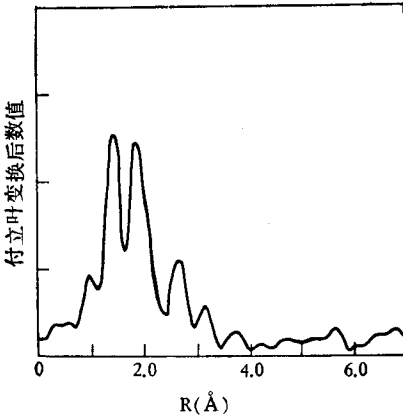


图9 细胞色素 C 氧化酶 EXAFS

细胞色素 C 氧化酶的 EXAFS 研究^[15], 表明氧化态时,平均 Cu-S 距离为 $2.27 \pm 0.02 \text{ Å}$, 平均 Cu-N 距离为 $1.97 \pm 0.02 \text{ Å}$, 由振幅可知每个铜原子结合 2 个氮原子, 1—1.5 个硫原子, 傅立叶变换形式表明有两种不同的铜中心 CuA 和 CuB (图 9), 而且可能有两个硫原子结合在一个铜上。

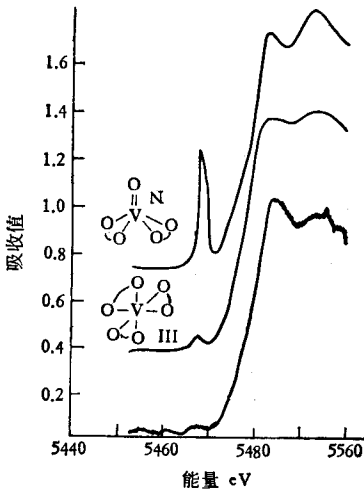


图10 钒吸收边

四、生物分子的 X 光吸收边研究

1. 吸收边的一般原理^[1,16] “边区域”的一般特点是在离吸收边 -20 到 0 eV 范围内存在一个或几个清晰的吸收峰(图 10), 或在原来连续吸收线上有不连续的上升, 然后在 0 到 30 eV 范围内于原来连续吸收上叠加上一系列很窄的共振峰。边前区的吸收线可解释为“束缚—束缚”过渡。对孤立原子可用角动量量子数标记, 如对 Cu(I) 离子 (d^{10} 构型), 最低可利用的过渡是 $1s \rightarrow 4s$, 和 $1s \rightarrow 4p$ 。对 Cu(II) 离子 (d^9 构型), 还有 $1s \rightarrow 3d$ 过渡。对孤立原子过渡能否实现, 由偶极选择定则决定。因此, 上面三种过渡只有 $1s \rightarrow 4p$ 是允许的。另一方面对分子中的离子, 则必须以原子簇的对称群(点群)为基础。因此, 对有中心对称的原子簇, 如平面四方铜氮络合物, 违犯奇偶性的过渡, 如 $1s \rightarrow 4s$ 和 $1s \rightarrow 3d$, 仍然是禁阻的。但对没有中心对称的原子簇, 如四面体铜氮络合物 $4p$ 和 $4s$ 轨道可以杂化成为分子的 T_2 态, 这样一来, $1s \rightarrow 4s$ 和 $1s \rightarrow 4p$ 的过渡, 对于偶极允许的分子来说, 就成为非禁阻的了。

这一特点在图 11 中可以看到。比吸收边低约 8eV 的小的类 3d 吸收, 在 Cu(I) 中是不存在的。谐振强度对分子对称性的依赖, 还示于图 12 中, $1s \rightarrow$ 类 3d 的过渡在正八面体

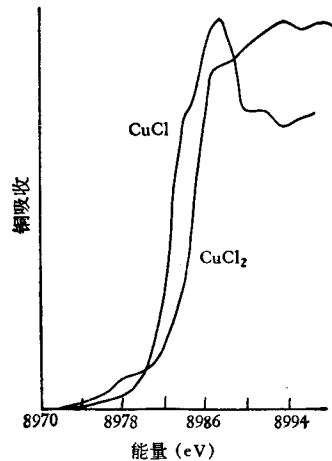


图11 铜吸收边

配位的钒中是很弱的。但由一个单 $\nu = \text{O}$ 键代替两个氧钒键,改变了对称性,这种过渡大为增加。

氧化态对吸收边的位置有明显的影 响。从一个离子上移去一个电子,吸收边的位置增加 3 eV。因此,从吸收边的位置可以确定离子的氧化态。

2. 一些研究结果

(1) 血清蛋白的研究^[17] 血清蛋白是在节肢动物和软体动物中发现的输氧蛋白。吸收边光谱可以说明其中铜的价态由于键合氧而发生的变化。脱氧血清蛋白中,吸收边出现在能量较低处,在 Cu(I) 的正常范围内有两个主要过渡折点(能量比 Cu(II) 低)。(图 12) 而在边前区没有 $1s \rightarrow 3d$ 束缚态的过渡,这与 Cu(I) 的边形式是一样的。当键合氧后,可清楚地看到吸收边移向了高能量处,平均大约 3 eV。在边前区,有一个小的 $1s \rightarrow 3d$ 的过渡。这一现象与吸氧后铜的氧化态变化是一致的。对于结合一氧化碳的血清蛋白,吸收边的拟合分析提出一个铜被完全还原,而另一个铜被部分还原。因此,吸收边近似为氧化和脱氧两种吸收边 1:1 的和。

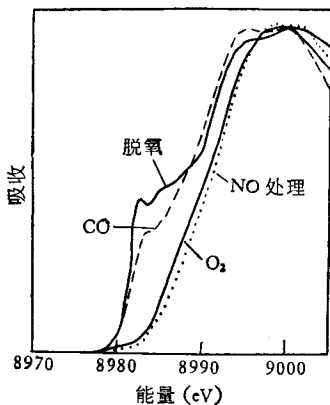


图 12 在四种形式血清蛋白中铜的吸收边

(2) 黄嘌呤氧化酶和亚硫酸盐氧化酶的研究^[10] 氧化态和连二硫酸盐还原态的黄嘌呤氧化酶中 Mo 的 K 吸收边示于图 13 中。与固氮酶 MoFe 成份的平滑 K 边不同,都显示了两个

折点。在约 20003 eV 处的第一个折点及其强度都有力地说明了有末端氧基连接在 Mo 上。第二个折点的位置,说明由于还原,高能量处折点向低能量方面移动了约 3.1 eV。这种移动可能是由于 Mo 的双电子还原,由 Mo(VI) 到 Mo(N),因为只有这两种价态的钼,才不具有 Mo 的 EPR 信号,与实验结果相一致(图 13)。

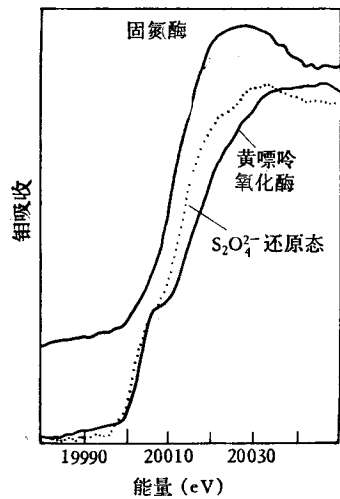


图 13 黄嘌呤和固氮酶吸收边

(3) 被囊动物细胞中的钒 这类动物细胞中含钒很多(某些情况下达到干重的 1%)。为了确定这类血细胞中钒离子的本质,进行了 X 光吸收边的研究^[16]。对含亚钒离子 $[\text{V}(\text{N}) = 0]^{+2}$ 的模型化合物的吸收边有一清楚的特征,相应于由 $1s$ 能级向配位体 P 轨道与钒 $3d$ 轨道构成的分子轨道过渡。而这种特征在被囊动物的原细胞和溶液都没有,表明都不含有亚钒离子。在被囊动物中钒离子应为 V(III),说明在此种酸性溶液中,有某种与细胞有关的机理来保持钒的低价态。

(4) 生物体系中钙的键合^[18,19] X 光吸收边对配位几何是敏感的。研究了各种钙的模型化合物。Ca-ATP 络合物的 Ca 吸收边与 CaHPO_4 的吸收边相类似。说明钙是键合在 ATP 的 $(\text{HPO}_4)^{2-}$ 基团上。

参 考 文 献

[1] Winick, H.: *Synchrotron Radiation Research*,

- Plenum, New York and London, 1980.
- [2] Doniach, S. et al.: *ibid.*, p. 425—457.
- [3] 中国科学技术大学:《合肥同步辐射装置预研制鉴定会资料》, 1981年, 合肥。
- [4] Teo, B. K. et al.: *EXAFS Spectroscopy*, Plenum, New York, 1981.
- [5] Shwلمان, R. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **124**, 305, 1978.
- [6] Cramer, S. P. et al.: *Prog. Inorg. Chem.*, **25**, 1, 1979.
- [7] Eisenberger, P. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 491, 1976.
- [8] Eisenberger, P. M. et al.: *Nature* (London), **274**, 30, 1978.
- [9] Cramer, S. P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3814, 1978.
- [10] Cramer, S. P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2298, 1978.
- [11] Tullius, T., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2776, 1979.
- [12] Cramer, S. P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2772, 1979.
- [13] Berg, J. N. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2774, 1979.
- [14] Powers L. et al.: *Biophys. J.*, **34**, 465, 1981.
- [15] Scott, R. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **78**, 664, 1981.
- [16] Azaroff, L. V., *X-ray Spectroscopy*, McGraw Hill, U. S. A., 1974.
- [17] Eccles, T. K. Ph. D. Thesis: *Stanford University*, 1977.
- [18] Powers, L. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **307**, 113, 1978.
- [19] Bianconi, A. et al.: *Chem. Phys. Lett.*, **59**, 121, 1978.

[本文于 1982 年 8 月 16 日收到]

金 属 硫 蛋 白

阎 脉 绍

(北京市工业卫生职业病研究所)

1957 年 Vallee 和 Margoshes 用含镉的食物喂大鼠, 结果从肾脏皮质层内分离出一种低分子量的蛋白质。它是一类与金属结合的并与金属有极大亲和力的蛋白质, 含有大量-SH, 是一种硫蛋白 (thioneins), 定名为 Metallothioneins 简称 MT。

Pulido 发现人接触镉、锌、铜以及汞等金属后肾脏内也有此类低分子蛋白质合成。MT 不仅存在于肾脏, 而且也在肝脏、心脏、睾丸以及皮肤细胞、淋巴细胞、纤维细胞和 Hela 细胞中发现。它是由金属离子诱导产生的一类特殊的具有对抗金属毒害作用的低分子量蛋白质。

一、物理化学特性及其分子组成

从分离出的 MT 测定表明: (1) 分子量为 6,000—10,000, (2) 等电点接近 pH 4, (3) 要使各种金属硫蛋白中有 50% 的金属离子发生解离的 pH 值为: Zn-MT, pH 3.5—4.5; Cd-MT, pH 2.5—3.5; Cu-MT 的 pH 为 2—3, (4) 吸收峰为: Cd-MT 为 250 nm 和 280nm; Zn-

MT 为 190nm 和 250nm; Cu-MT 为 270nm, (5) 每 1 克原子金属离子同三个半胱氨酸残基结合, (6) Cd-MT 的解离常数是 10^{-25} , Zn-MT 是 10^{-24} ; 铜离子的结合要比镉和锌更牢固。

用羧肽酶和柱层析法测定哺乳类动物(马、家兔、大鼠和小鼠等)肾脏内 MT 蛋白质分子中氨基酸组成和排列顺序(图 1), 说明这些诱导合成的 MT 除了金属离子的数目和氨基酸排列顺序有差异外, 基本结构是一致的, 都是由 61 个氨基酸组成的多肽链, 其中半胱氨酸的含量最高, 约占 33%, 丝氨酸 14%, 赖氨酸 13%, 一般只含一个蛋氨酸。而且半胱氨酸在肽链上的位置也都相同(图 2)。

MT 分子多肽链的氨基端和羧基端分别是 N-乙酰蛋氨酸及丙氨酸。MT 分子内含有双硫键或自由的-SH。所有的半胱氨酸侧链都与金属离子相结合, 形成硫醇复合物。

人肝脏内诱导合成的 MT 与动物体内合成的 MT 基本相似。Kagi 氏分析了人肝脏内诱导合成的 Zn-MT, 它占整个肝脏湿重的 0.002