

尔硫酸软骨素A所结合的金属离子的摩尔数而言的,滴定 Cu^{2+} 离子所用的 ChSA-H_2 的量少,可能是因为 Cu^{2+} 与 ChSA-H_2 结合的动力学过程快,易于达到平衡;而 Ca^{2+} 则相反,它达到平衡较慢,故需较多量的 ChSA-H_2 。同样,在用 pH 法测定 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 与 ChSA-H_2 的结合时,亦有类似的情况。如图 3 所示,由于 CaCl_2 溶液的初始 pH 值大于 CuSO_4 溶液的初始 pH 值,在 $\Delta\text{pH-V}_{\text{ChSA-H}_2}$ 的曲线中是前者低于后者。但在加入 0.5 毫升 ChSA-H_2 后, Ca^{2+} 的滴定曲线较平坦而 Cu^{2+} 的滴定曲线较陡直。

玉木国夫等^[18]曾研究过高分子多聚电解质与相反离子的互相作用,认为在分子多聚电解质中存在的羧基和硫酸根对于碱金属阳离子的结合能力差异颇大。硫酸软骨素A中所含有的羧基和硫酸根,在本实验条件下,究竟是如何与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 离子成键的? 这仍是一个尚待研究的课题。

参 考 文 献

[1] 米勢政勝等: 日化, 1, 108, 1978。

- [2] M. Nakagake et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 555, 1968.
 [3] 成都制药三厂: 《新医学通讯》, **5**, 53, 1977。
 [4] 南京生化制药研究所, 内部资料。
 [5] 中垣正幸等: 《藥学雜誌》, **99**, 618, 1979。
 [6] D. R. Williams Ed.: *An Introduction to Bioinorganic Chemistry*, Charles C Thomas, U. S. A. (1976) Chap 12.
 [7] 王世中等: 《药学报》, **15**, 163, 1980。
 [8] T. S. Foster et al.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1771, 1961.
 [9] D. Freifelder: *Physical Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, p. 211, 1976.
 [10] 南京大学生化教研室: 《生物化学实验》, 人民教育出版社, P. 39, 1979。
 [11] T. Bitter et al.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330, 1962.
 [12] F. A. Balazs et al.: *Anal. Biochem.*, **12**, 559, 1965.
 [13] K. S. Dodgson: *Biochem.*, **J.** **78**, 312, 1961.
 [14] M. B. Mathews et al.: *Nature*, **181**, 421, 1958.
 [15] S. Honda et al.: *J. Biochem.*, **76**, 209, 1974.
 [16] M. B. Mathews: *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 367, 1956.
 [17] 拓植英哉等: 日化, **4**, 609, 1978。
 [18] 玉木國夫等: 日化, **7**, 711, 1971。

[本文于 1982 年 12 月 1 日收到]

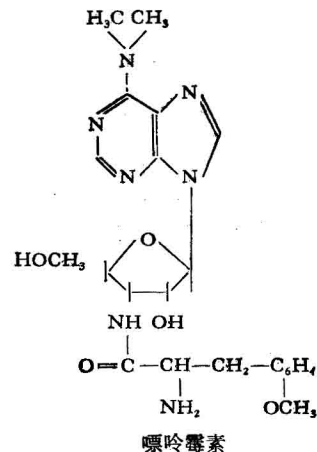
“嘌呤霉素反应”在研究蛋白质合成抑制剂作用机制中的应用

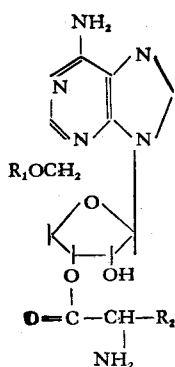
方福德 吴冠芸 左瑾

(中国医学科学院基础医学研究所)

蛋白质合成抑制剂在生化研究及医学应用中具有重要的作用。原核细胞和真核细胞中蛋白质合成是一个复杂的过程, 对于一个蛋白质合成抑制剂, 只有搞清其作用机制, 才能有目的地加以利用或改造。为了阐明一个蛋白质合成抑制剂的作用机制, 应从不同的角度设计实验方案, 以期彼此印证。在这些实验方案中, “嘌呤霉素反应”对于确定转肽作用抑制剂是一个简便而可靠的方法。

嘌呤霉素是氨酰 tRNA 的 3' 末端 AMP 残基的类似物:





氨酰-tRNA 的 3' 末端

它能以其 α -NH₂ 与核糖核蛋白体大亚基上给位(P位)的蛋氨酸(或甲酰蛋氨酸)或新生肽的羧基末端联结(形成酰胺键),产生蛋氨酰(或甲酰蛋氨酰)嘌呤霉素或肽酰嘌呤霉素复合物,这些复合物因易从核糖核蛋白体上掉落下来,故不能继续蛋白质的生物合成,它的作用环节在转肽作用。如果其抑制剂对转肽作用具有抑制性,则会减少新生肽与嘌呤霉素的结合。根据这一原理,我们比较系统地观察了一些已知作用机制的蛋白质合成抑制剂对该反应的影响,得到了预期的结果。现将实验情况介绍如下。

一、材料和方法

1. 抑制剂

春日霉素(Kasugamycin),螺旋霉素(Spiramycin),壮观霉素(Spectinomycin),红霉素(Erythromycin)和林可霉素(Lincomycin)由本院抗菌素研究所赠送。吐根碱(emetine)由本院药物研究所赠送。氯霉素、链霉素和四环素由本室基因工程组赠送。嘌呤霉素: Aldrich 产品。放线菌酮 Fluka 产品。NaF 和 NaCl: 北京化工厂产品,分析纯。以上抑制剂均用无菌无离子水配制成所需浓度。林霉素和螺旋霉素较不易溶于水,配制时先以稀盐酸助溶,再调整 pH 至中性。³H-嘌呤霉素(盐酸盐): 比放射性 6.4 Ci/mmol, Amersham 产品。

2. 方法

(1) 大鼠肝多聚核糖核蛋白体的制备 同文献[1]。所得制品的特性光谱比值(以水为介质)是: $A_{260}/A_{280} = 1.70$, $A_{260}/A_{235} = 1.45$, 与

文献报道值一致。

(2) 兔网织红细胞溶解物(RRL)的制备及处理 同文献[2]

(3) 多聚核糖核蛋白体翻译活性的测定 采用微球菌核酸酶处理过的 RRL 体系。具体反应条件参照张海澜等改进的方法(未发表资料)。由以上方法制备的多聚核糖核蛋白体,其翻译活性(以³H-亮氨酸掺入新生肽链的 cpm 计)一般都为内源掺入的 50 倍以上。

(4) 嘌呤霉素反应 按 pestka 法^[3]略作改变。具体操作是: 反应总体积 50 μ l, 内含 0.05 M Tris-HCl, pH7.4, 0.5 M KCl, 0.005 M MgCl₂, 5 μ M ³H-嘌呤霉素, 指定浓度的抑制剂, 以及 2.0 A₂₆₀ 的多聚核糖核蛋白体。多聚核糖核蛋白体要最后加入并立即于 25°C 水浴保温 1 分钟(秒表计时), 反应液转移到盛有 2ml 预冷的 10% TCA 的试管中, 在冰水浴中置 10 分钟, 酸不溶物由抽滤法转移至国产 49 型玻璃纤维滤膜(直径 2cm)上, 用 5% TCA 洗涤 6 次(每次 3ml), 再用无水乙醇洗涤 8 次(每次 3ml), 膜片干燥后于 Beckman LS 8000 液体闪烁计数器测量放射性, 闪烁液组成是: 0.3% PPO, 0.03% POPOP, 以甲苯为溶剂。

以上各项实验所用的器具及溶液均保持无菌。反应用小试管先硅化后消毒。对照组除不加抑制剂外, 余均同加抑制剂组。每组设 2—3 个平行管。本实验中所用抑制剂浓度均参考文献所用的浓度, 在各该浓度下, 对细胞或无细胞体系的蛋白质合成产生了显著的抑制作用。

结果与讨论

本实验应用一些已知作用机制的蛋白质合成抑制剂(包括起始合成抑制剂、肽链延伸抑制剂和肽链终止抑制剂)以探讨它们对嘌呤霉素反应的影响的差异性及专一性。结果总结于附表 1 中。由表可见, 在本实验条件下, 起始合成抑制剂及肽链终止合成抑制剂对反应均无抑制作用, 其中 NaF、NaCl 和链霉素对该反应还有一定程度的促进与加强作用。肽链延伸抑制剂可以抑制该反应, 但由于肽链延伸过程包括

表1 一些蛋白质合成抑制剂对肽酰-³H-嘌呤霉素复合物形成的影响¹⁾

作用环节		抑制剂名称	浓 度 (M)	肽酰- ³ H-嘌呤霉素形成的抑制率 (%±S.D.)
起始合成阶段		春日霉素 ⁴⁾	2.6×10 ⁻⁴	-4.7±8.8
		NaF	5.2×10 ⁻⁴	-3.2±0.8
			3×10 ⁻²	-50.0±28.3
			6×10 ⁻²	-35.4±11.2
		NaCl	1.5×10 ⁻¹	-65.1±22.5
肽链延伸阶段	第一个肽链形成	螺旋霉素 ⁴⁾	1×10 ⁻⁴	-8.7±3.8
			2×10 ⁻⁴	-11.0±10.0
	转肽作用	嘌呤霉素	2×10 ⁻⁵	18.4±10.3
			1×10 ⁻⁴	67.9±4.0
			1×10 ⁻⁴	17.5±1.4
			2×10 ⁻⁴	37.8±11.1
	转位作用	林可霉素 ⁴⁾	1×10 ⁻⁴	-26.5±14.2
			2×10 ⁻⁴	-15.2±8.4
		吐根碱	1×10 ⁻⁴	1.5±0.4
			2×10 ⁻⁴	2.0±3.7
		壮观霉素 ⁴⁾	9×10 ⁻⁴	1.5±7.5
			1.8×10 ⁻³	3.5±4.6
		氯霉素 ⁴⁾	1×10 ⁻⁴	3.0±2.9
			2×10 ⁻⁴	2.0±4.0
		红霉素 ⁴⁾	1×10 ⁻⁴	1.4±4.2
			2×10 ⁻⁴	4.0±5.7
肽链终止阶段		链霉素 ³⁾⁴⁾ 四环素 ⁵⁾	2×10 ⁻⁴	-50.7±9.6
			1×10 ⁻⁴	-7.2±10.1

- 1) 各次实验的对照组 cpm在 6000—7000 范围内
2) 也是转位抑制剂
3) 也是起始合成抑制剂
4) 主要在细菌及无细胞体系中研究过
5) 也抑制氨酰 tRNA 与受位(A 位)结合

放线菌酮是以非竞争性或混合型方式抑制嘌呤霉素反应的^[4]，从它的结构与嘌呤霉素差别悬殊这一点来看，这种可能性也是比较大的。此外，当反应体系中存在非标记嘌呤霉素时，因它们与 ³H-嘌呤霉素完全起竞争性抑制作用，肽酰-³H-嘌呤霉素复合物的生成量急剧减少，此种减少也取决于非标记嘌呤霉素的浓度。

在理论上，起始合成抑制剂、转位抑制剂和肽链终止抑制剂由于对 P 位上的新生肽不发生作用，因而不会妨碍 P 位上的新生肽与 ³H-嘌呤霉素的结合，本文实验结果也证明了这一点。此外，与已形成肽的核糖核蛋白体的数量相比，反应条件中多聚核糖核蛋白体上处于第一个肽键形成阶段的核糖核蛋白体的数量相对很少，所以在本实验条件下第一个肽键形成抑制剂螺旋霉素对反应亦无影响。

Pestka^[4] 指出，用哺乳类细胞多聚核糖核蛋白体体系测定肽酰-³H-嘌呤霉素复合物的形成，比用人工合成的供体及高盐溶液洗涤过的核糖核蛋白体作类似实验更接近于生理状态，并且由这个体系所得的结果可以反映抑制剂在完整细胞内的真实作用机制。我们曾将本文所述的方法和其他一些方法结合起来用于某些以抑制蛋白质合成为其分子基础的抗癌药物作用机制的研究，得到了彼此一致的结果。因此，我们认为本法在有关蛋白质合成受抑机制的研究中，是值得应用的简便而可靠的方法之一。

参 考 文 献

[1] 吴冠芸等:《生物化学与生物物理进展》3, 27, 1982。
[2] 吴冠芸等: 同上, 4, 52, 1982。
[3] Pestka, S. et al.: *J. Biol. Chem.* 247, 4258, 1972。
[4] Pestka, S. et al.: *ibid.*, 247, 6895, 1972。
[5] Huang, M. T. *Mol. Pharmacol.*, 11, 511, 1975。
[6] Mao, J. C. H. et al.: *Biochemistry*, 10, 2054, 1971。

[本文于 1982 年 12 月 10 日收到]

若干步骤，我们又分别观察了第一个肽键形成抑制剂、转肽抑制剂和转位抑制剂的作用。结果表明，在肽链延伸抑制剂中，除转肽抑制剂外，皆无抑制该反应的效力。由表还可看到，放线菌酮对嘌呤霉素反应的抑制作用与其浓度有关 在 0.2mM 浓度下，具有中等程度的抑制作用，与文献报道的结果^[4,5]相近。有的作者认为，