

专 论 与 综 述

乙酰胆碱酯酶的结构和功能*

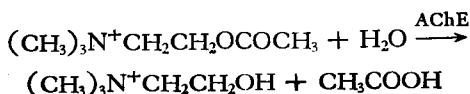
孙 曼 霁 周 廷 冲

(军事医学科学院基础医学研究所)

一、胆碱能传递和胆碱酯酶

神经冲动的传播由两种方式延续性地运行,即生物电的传导和化学递质的中介作用。已发现的神经系统的化学递质有乙酰胆碱(Ach)、去甲肾上腺素、 γ -氨基丁酸谷氨酸、甘氨酸及P物质等,其中以Ach为最主要。以Ach为递质的神经总称为胆碱能神经,或者胆碱能系统,它包括副交感神经及交感神经的节前纤维,副交感神经及少数交感神经的节后纤维,骨骼肌神经以及中枢神经系统中许多神经元之间的联系。因此胆碱能系统对植物性神经调节、肌肉运动和人脑的思维、学习和记忆都有着极为重要的作用。

Ach是胆碱能神经末梢释出的化学递质,分子式为 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$,它在胆碱乙酰化酶的催化下,以高能键化合物乙酰辅酶A作为乙酰基供体,以胆碱为接受体,使胆碱乙酰化,在神经元胞浆中合成Ach,而后储存于突触小泡内;当神经冲动沿轴突传到神经末梢时,突触小泡按照细胞外排模式将其中含有的Ach以量子方式越膜外排至突触间隙,作用于突触后膜上的胆碱能受体,引起下一级神经元或者效应器的激发。Ach在完成传递后,在数毫秒之内被分布在突触前、后膜上的AChE迅速地水解,转化成醋酸和生理作用很弱的胆碱,从而维持了正常的神经功能。其反应式如下:



胆碱酯酶是一类专一性的水解酶,催化胆碱酯类及其它一些酯类的水解反应,依其对底物作用性质的不同分为两个亚类:(1)真性胆碱酯酶。学名乙酰胆碱水解酶(EC3.1.1.7.AChE)它催化胆碱酯的速度顺序是:乙酰胆碱>丙酰胆碱>丁酰胆碱,并能专一地催化 β -甲基乙酰胆碱的水解反应,主要分布在神经细胞,神经肌接头、红血球膜及鱼类的发电器官。(2)假性胆碱酯酶。学名酰化胆碱酰基水解酶(EC3.1.1.8.BuChE)它催化胆碱酯的速度顺序是:丁酰胆碱>丙酰胆碱>乙酰胆碱,除啮齿类动物外,能专一地催化苯酰胆碱的水解反应,主要分布在神经胶质细胞、血浆、肝脏及肠粘膜。

胆碱酯酶中具有生理功能的主要是AChE。对材料易得AChE含量又丰富的鱼类发电器官中的AChE已做了相当详尽的研究,本文就其结构和功能加以讨论。

二、胆碱酯酶的结构

胆碱能系统的研究,近年来转向胆碱能受体,但在AChE领域中无论在活性区域,亚基结构,分子型特征以及免疫学性质等方面,仍然取得重要进展。

AChE是一种糖蛋白^[1],含有少量的氨基葡萄糖和半乳糖胺。它存在于神经细胞和红血球膜上,轴比小于5,属于球状蛋白质。Leuzinger等在1973年获得AChE结晶^[2],为AChE的结构研究提供了必要的实验材料。

* 此文系周廷冲教授1980年9月在长春中国生物化学会“酶结构与功能讨论会”上的综述报告,现略有增删。

C. Chothia 及 W. Leuzinger (1975) 用 *E. electricus* 电器官制备纯化的 AChE, 酶比活性为 750 毫摩尔 Ach/小时/毫克蛋白质, 沉降系数 11.1S, 分子量 26 万, 属球型分子。经 0.05M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 和 37—42% 饱和的硫酸铵溶液透析后, 获得 AChE 晶体。晶体生长非常缓慢, 数周内只生成线度为 10—60 微米的微晶, 数月后长至 100 微米左右, 经过三年才生长出 0.3 毫米至 3.2 毫米的晶体。X 光衍射分析表明晶体属于空间群 $P6_222$ (或 $P6_422$), 晶胞大小为 $a = b = 187 \text{ \AA}$, $c = 292 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ 。晶体结构及聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱指出其分子为四聚体, 最大体积为 $93 \text{ \AA} \times 81 \text{ \AA} \times 97 \text{ \AA}$ 。尾型 AChE 分子 (9S、14S、18S) 的尾巴结构可能是由一个连在每个亚基上的 α -螺旋多肽所

构成。

1. 一级结构 系由线性排列的氨基酸构成的多肽链。其氨基酸组成^[1]及酯解部位活性氨基酸附近的氨基酸顺序均已发表。

(1) 氨基酸组成 从 AChE 和 BuChE 的氨基酸种类及相对克分子百分率 (表 1) 可知酸性氨基酸含量为 19—23%, 碱性的为 12—13%, 余为中性的, 因而它们都是酸性蛋白质。等电点较低, 在 4.5—4.8 之间。不同来源的胆碱酯酶的氨基酸组成相似; 亲缘关系愈近, 相似性愈大。真性与假性 ChE 之间的差别就大一些。

(2) 酯解部位酰化基团附近的氨基酸排列顺序 自放射性同位素应用以来, ^{32}P 标记的有机磷化合物被用来作为研究 ChE 的专一性试

表 1 胆碱酯酶的氨基酸组成(克分子%)

氨基酸	电 鳗 电 器 官				电鳗电器官 11S AChE Taylor P. (1974)	牛红血球 AChE Berman J. D. (1973)	银环蛇毒 AChE Grobmann H. (1979)	金环蛇毒 AChE Kumar V. (1973)	眼镜蛇毒 AChE Grobmann H. (1979)	猪胰腺 BuChE Tucci A. F. (1969)
	16S AChE Lwebuga- Mukasa J. S. (1976)	11S AChE								
		Leuzinger W. (1967)	Rosenberry T. L. (1972)	Dudai Y. (1972)						
赖氨酸	5.17	4.4	4.4	4.7	5.0	6.1	3.3	2.9	4.0	5.3
组氨酸	2.61	2.2	2.3	2.1	2.9	1.5	2.0	1.9	2.6	1.9
精氨酸	4.80	5.4	5.1	5.0	4.7	4.2	5.4	5.7	5.9	4.4
半胱氨酸		1.2	1.6	0.9	1.5	0.8	1.2	0.95	1.2	0.9
门冬氨酸	9.69	10.9	12.8	12.2	11.0	7.8	11.1	11.4	10.5	11.5
苏氨酸	4.72	4.4	4.4	4.1	4.2	5.2	4.9	4.8	4.3	5.3
丝氨酸	7.87	6.9	6.6	6.8	8.2	10.6	6.3	6.7	6.4	8.9
谷氨酸	11.82	9.4	10	11.1	11.1	11	9.3	9.5	9.8	11.4
脯氨酸	6.64	8.1	5.8	6.9	5.2	4.6	8.3	8.6	8.7	7.6
甘氨酸	11.42	7.7	8.6	8.9	8.1	12.8	8.4	8.6	9.2	10.5
丙氨酸	5.85	5.6	6.1	7.4	4.4	10.3	7.6	7.6	7.4	10.1
缬氨酸	6.57	6.9	6.9	6.9	6.6	7.1	6.0	6.7	6.6	4.0
蛋氨酸	2.20	3.0	2.6	1.3	2.9	1.5	2.0	1.9	1.5	1.0
异亮氨酸	4.64	3.7	3.6	4.0	4.2	2.7	3.8	2.9	4.5	2.3
亮氨酸	8.66	8.9	8.4	8.2	9.0	7.3	10.1	10.5	9.5	7.6
酪氨酸	2.34	3.9	3.6	2.9	2.7	3.2	3.8	3.8	2.3	2.1
苯丙氨酸	5.08	5.4	5.1	5.1	5.6	3.4	5.0	5.7	5.0	5.1
色氨酸		2.0	2.0	3.4	2.9		1.7		0.7	
羟脯氨酸	1.12									
羟赖氨酸	0.3									
极性氨基酸	46.68	43.6	45.6	46.0	47.1	46.4	42.3	42.9	43.5	48.7
酸性氨基酸	21.51	20.3	22.8	23.3	22.1	18.8	20.4	20.9	20.3	22.9
碱性氨基酸	12.58	12.0	11.8	11.8	12.6	11.8	10.7	10.5	12.5	11.6

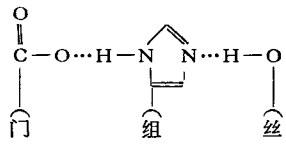
剂，它对 ChE 产生强烈抑制， PI_{50} 值大于 6，有的可达 8—9。磷原子与酯解部位活性丝氨酸的羟基氧原子发生共价结合，形成磷(膦)酰化的酶，经酸或蛋白水解酶降解分离出带放射性标记的肽片，以测定其氨基酸顺序。除 ChE 外，发现一些酯酶、蛋白水解酶及某些可以被磷酰化的酶 ^{32}P 都连接在活性丝氨酸上，称作“丝氨酸酶类”，其标记肽片的氨基酸顺序有一定相似性，可能是种族或个体进化中的痕迹。AChE 活性区域肽片的氨基酸顺序是 1973 年才弄清楚

的。

2. AChE 的活性区域 指酶分子表面能够识别底物并催化其转变的局部结构，它在蛋白质的三级结构中形成。Wilson 首先提出了胆碱酯酶活性区域的模式图，又经后人修正和补充。一般认为由酯解部位、阴离子部位及周围部位等组成。

(1) 酯解部位 即 AChE 使底物水解的催化部位，至少由三个活性基团构成。(即酸性基团——酪氨酸酚羟基，碱性基团——组氨酸咪唑基，酰化基团——丝氨酸羟基。)

放射性有机磷化合物标记实验发现磷(膦)酰基结合在丝氨酸的羟基上，人们对此甚为惊异，因为丝氨酸羟基的反应不足以参与酰化和去酰化机转，必须经过活化。现在知道酯解部位存在一个埋藏在酶分子内部的解离的门冬氨酸，它吸引组氨酸咪唑氮原子上的一个质子，产生共轭效应，使咪唑基上另一个氮原子与丝氨酸羟基上的质子形成氢链，从而使活性丝氨酸上的氧原子具有强大的亲核性，这个系统被称作电荷接力系统^[2]。



除上述三种活性基团外，现在已经证明的还有巯基和去烷化基团。

(2) 巯基基团 经过长时间的争论，看来巯基的确是 AChE 活性区域的一个活性基团，至少电鳗的 AChE 是这样。我们实验室在 1963

表 2 丝氨酸酶类活性区域酰化基团邻近的氨基酸顺序

酶	氨基酸顺序	文 献
真性胆碱酯酶(电鳗电器官)	甘-谷-丝*-丝-谷	Schaffer, N. K. (1973)
假性胆碱酯酶(马血清)	甘-谷-丝*-丙-甘	Jansz, H. S. (1959)
脂族酯酶(马肝)	甘-谷-丝*-丙-甘	Jansz, H. S. (1959)
葡萄糖磷酸变位酶	甘-谷-丝*-丙-甘	Tucci, A. F. (1969)
糜蛋白酶	甘-门-丝*-甘	Oosterbann, R. A. (1958)
胰蛋白酶	甘-门-丝*-甘	Dixon, G. H. (1958)
凝血酶	甘-门-丝*-甘	Glader, J. A. (1958)
弹性蛋白酶	甘-门-丝*-甘	Hartley, B. S. (1959)
链霉蛋白酶	门-丝*-甘	Wähby, S. (1968)
α -蛋白酶 (<i>Sorangium</i> sp.)	门-丝*-甘	Whitaker, D. R. (1967)
枯草杆菌酶	苏-丝*-蛋-丙	Sanger, F. (1960)
曲菌蛋白酶	苏-丝*-蛋-丙	Shaw, D. C. (未发表)
磷酸化酶 a	异亮-丝*-缬-精	Fisher, E. H. (1959)
UDP 葡萄糖, α -1, 4-葡聚糖, α -葡糖基转移酶	异亮-丝*-缬-精	Larner, J. (1965)
蛋白酶 (<i>Anthrobacter</i>)	丝-丝*-甘	Wähby, S. (1968)
碱性磷酸酯酶(大肠杆菌)	苏-门-丝*-丙-丙	Schwartz, J. H. (1963)

年曾经证实了这一点。对氯汞苯甲酸 (PCMB) 为常用的巯基试剂，用它对三种不同酶源的 AChE 活性做了试验，发现 PCMB 对猪脑或猪红血球 AChE 活性没有明显的抑制作用。而 0.5—5mM 的 PCMB 对电鳗 AChE 活性的抑制就较显著。在加入二巯基丙磷酸钠 (DMPS) 10mM 后，被抑制的电鳗 AChE 的活力几乎全部可以恢复(表 3)。

为了弄清 PCMB 所作用的巯基与 AChE 的活性区域是否有关，或仅由于 PCMB 的作用使酶蛋白发生了构象的变化，促使 AChE 的活性降低或丧失，可采取简单的对酶的先后交叉抑制法。一组实验先形成 PCMB 抑制的电鳗 AChE，再用梭曼或沙林抑制。另一组的实验次序相反，在透析除去剩余毒物后，再用氯磷啶 (2-PAM·Cl) 及 DMPS 来检查 AChE 活性恢复的

表 3 对氯汞苯甲酸对乙酰胆碱酯酶活性的影响

PCMB 浓度 (mM)	AChE 活性(分解 Ach 微克分子数/30 分钟)			
	(A) 电 鳗		(B) 猪脑	(C) 猪红血球
	不加 DMPS	加 DMPS		
0.....	6.27	6.27	3.22	4.65
0.04...	...	...	3.30	4.57
0.1...	...	...	3.30	4.49
0.2...	...	...	3.14	4.57
0.5...	4.56	6.38	3.14	4.49
0.75...	4.05	6.17	..	...
1.....	2.70	6.17	3.02	4.57
2.....	...	...	3.18	4.49
3.....	0.16	5.45	...	...
5.....	0.26	5.50	3.06	

A. 电鳗 AChE 在 pH7.2、0℃ 与 PCMB 作用 1 小时，加 10mM DMPS，20 分钟后测酶活性。B. 猪脑 AChE 在 pH 7.2、25℃ 与 PCMB 作用 30 分钟后，测酶活性。C. 经洗涤的猪红血球在 pH7.2、37℃ 与 PCMB 作用 30 分钟，洗涤后测酶活性。

情况。根据梭曼膦酰化 AChE 难重活化及沙林膦酰化 AChE 易重活化的性质，并结合在有机磷毒剂抑制前后，用 PCMB 处理就可以判断 PCMB 是否也同样作用在酶的活力中心。

表 4 充分说明电鳗 AChE 经 PCMB 处理后，梭曼或沙林不再对它起作用。表 5 表明在梭曼或沙林先形成膦酰化酶后，PCMB 也不再

表 4 先加 PCMB 后加有机磷化合物对 AChE 重活化作用的影响^[3]

组 别	AChE 活性(分解 Ach 微克分子数/30 分钟)			
	第一次实验		第二次实验	
	对照	氯磷定	对照	氯磷定
对照				
(1) 对照	对照	3.52	4.57	4.00
	DMPS	3.69	4.64	4.00
(2) 梭曼	对照	0.23	0.46	0.00
	DMPS	0.17	0.46	0.00
(3) 沙林	对照	0.40	3.92	0.00
	DMPS	0.23	4.05	0.13
PCMB				
(4) 对照	对照	0.03	0.19	0.00
	DMPS	3.63	3.67	3.28
(5) 梭曼	对照	0.00	0.00	0.00
	DMPS	1.67	1.92	1.13
(6) 沙林	对照	0.00	0.00	0.00
	DMPS	2.05	3.21	1.14

电鳗 AChE 与 3mM PCMB 作用 45 分钟，透析后，再用 10⁻⁵M 梭曼或 10⁻⁴M 沙林中毒 30 分钟。再透析用 0.1M 氯磷定活化 20 分钟并透析。再加 10⁻²M DMPS，15 分后测酶活性。透析前后及中毒时均在 0℃ 进行。

起作用，表现在 DMPS 加入与否对酶活性无明显影响，氯磷定仍然对沙林膦酰化酶有重活化作用，而对梭曼膦酰化酶没有作用。

交叉抑制实验说明 PCMB 和有机磷毒物都

表 5 先加有机磷毒剂后加 PCMB 对 AChE 重活化作用的影响^[3]

组 别			AChE 活性(分解 Ach 微克分子数/30 分钟)					
			第一次实验		第二次实验		第三次实验*	
			对照	氯磷定	对照	氯磷定	对照	氯磷定
对照	{	对照	4.22	...	4.61	...	...	...
		DMPS	4.43	...	4.29	...	...	...
	{	对照	0.38	...	1.13	...	0.57	...
		DMPS	5.96	...	4.99	...	2.39	...
梭曼	{	对照	0.09	0.05	0.09	0.11	...	...
		DMPS	0.09	0.00	0.09	0.13	...	...
	{	对照	0.09	0.11	0.10	0.13	...	...
		DMPS	0.05	0.14	0.08	0.18	...	...
沙林	{	对照	0.32	3.03	0.42	5.45	0.30	4.43
		DMPS	0.27	3.03	0.19	5.37	0.00	3.82
	{	对照	0.27	3.28	0.27	4.49	0.00	3.69
		DMPS	0.36	3.68	0.30	4.80	0.00	4.15

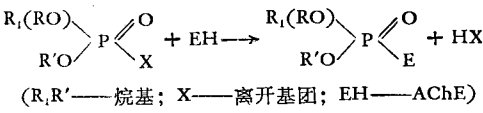
* 实验条件与毒剂或药物浓度同表 4。

是作用在电鳗 AChE 的活性区域, 因此可以认为, SH 基是电鳗 AChE 活性区域的组成部分。

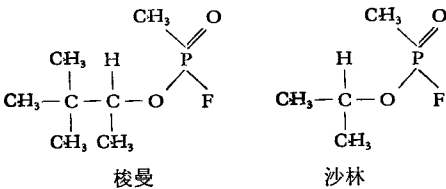
Morrisett 等^[4]用自旋标记法对电鳗膜上的 AChE 做了研究, 证明 AChE 活力中心的空间范围较广, 并位于酶的表面, 膜上有一个巯基位于非常靠近活力中心的地方, 可与自旋标记物 1-氧化-2, 2, 6, 6-四甲基-4-哌啶基-甲氟磷酸酯相互作用。膜结合的 AChE 和溶液化的 AChE 构象变化不大。

L. A. Mounter 等 (1953) 观察了巯基试剂对胆碱酯酶的影响, 发现一些巯基试剂可产生抑制作用, 而且用巯基化合物处理后还可以使被重金属抑制的酶重新恢复活性。虽然在他们的结论中认为所试的胆碱酯酶活力中心不包含巯基, 但综合我们及 Morrisett 等的实验结果证明至少某些种属的酶的活性区域有巯基参加。

(3) 去烷基基团 有机磷化合物带有部分正电荷的磷原子具有亲电子性, 可与 AChE 活性区域丝氨酸的羟基氧原子发生共价结合, 生成磷(膦)酰化的酶, 使 AChE 失去催化 Ach 分解的能力。反应式如下:



磷(膦)酰化酶的生成并不是反应的终结, 随着时间的推移, 它由一种可以被亲核试剂重活化的状态转变成另一种不能被重活化的状态, 这种现象叫做老化。不同的磷(膦)酰化 AChE 的老化速度相差非常悬殊, 这主要取决于有机磷化合物的结构。如沙林 (Sarin) 是以小时或天为单位的, 而梭曼 (Soman)



膦酰化的 AChE, 我们实验室在 1963 年证明此反应几乎是在瞬间完成的, 其老化的实质是特己基的脱落^[5]。

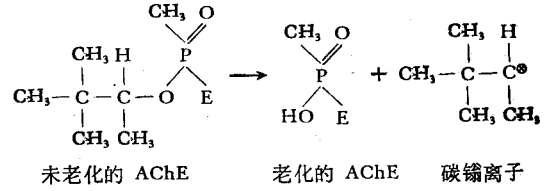


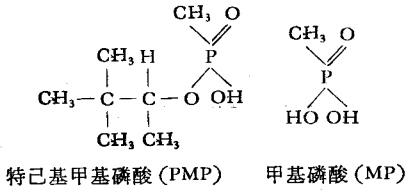
表 6 沙林梭曼抑制的乙酰胆碱酯酶的去烷基反应

37℃ 孵温时间	碱水解产物的相对含量百分率(%)			
	沙 林		梭 曼	
	³² P-MP	³² P-IMP	³² P-MP	³² P-PMP
3 分 钟	...	...	82	18
5 分 钟	...	...	94	6
10 分 钟	...	...	93	7
5 小 时	8	92	...	...
24 小 时	30	70	...	...
48 小 时	44	56	...	...

50mM³²P 标记沙林或梭曼在 37℃、pH7.2 与 AChE 作用不同时间后沉淀蛋白质、经洗涤、水解及纸层分离, 测放射性强度。

梭曼膦酰化 AChE 在生理条件下 (37℃, pH7) 迅速地脱去烷基, 若用沉淀剂使膦酰化 AChE 迅速变性后, 所获的蛋白沉淀用骤烈的条件 (0.01N NaOH, 100℃、10 分钟) 处理, 没有碳镙离子脱落, 说明去烷基反应是一种酶促反应^[5]。去烷基反应的 pH 依赖性, 反应速度与温度的相关性, 也都支持这一判断。

若将梭曼的水解产物 PMP 给大白鼠注射, 大部分呈原形从尿中排出, 完全没有 MP 出现, 说明体内不另外存在催化去烷基的酶系统^[6], 可见未曾老化的膦酰化酶的去烷基反应是受



AChE 活性区域里的某个活性基团催化的, 也就是说去烷基反应是 AChE 的一种自身催化作用。

系统中酸碱度对去烷基反应的影响很大, pH 低时反应速度明显加快, 而碱性环境中则要慢得多^[7,8]。这可能表明老化反应是亲电子性质的催化反应, 糜蛋白酶和 AChE 具有相似的

酯解部位,只是缺少阴离子部位。梭曼抑制的糜蛋白酶在 24 小时内无老化发生^[20],说明 AChE 的阴离子部位在去烷基反应中起着重要的作用。一些季铵化合物作为阴离子部位的抑制剂可以起到一定程度的防老化作用^[12],也支持这种推断。阴离子部位是酸性氨基酸的羧基侧链,或许它就是去烷基催化基团。

Fleisher 等^[7]也报道了梭曼磷酸化 AChE 的去烷基反应。Michel 等^[8]又发现脱落烷基以碳鎓离子形式进入溶液中,并发生特己基分子重排作用。

去烷基的磷酸化 AChE 不能自动恢复酶活性,中毒动物 AChE 的恢复只能靠酶的新生。我们实验室许小珊等观察了大白鼠隔肌局部梭曼中毒(2 微克/0.01 毫升)后,局部运动终板的 AChE 迅速地,完全地被抑制。AChE 的新生是缓慢的,中毒后 3 天略有出现,14 天才恢复正常^[21]。

沙林和梭曼具有两种旋光异构体(l 型及 d 型)都能使胆碱酯酶酰化,并发生老化,例如 ³²P-梭曼消旋体抑制的牛红血球 AChE,98% 发生脱烷基作用^[7],³²P-DFP 消旋体抑制的马血清假性 ChE,24℃,8 小时内即有 67—74% 的磷酸化酶发生去烷基反应,两种异构体的酰化速度不同,抑制强度也不同,l 型比 d 型强 10—20 倍,但老化速度的差别,至今还没有研究过。

有机磷化合物的类型对老化速度影响亦很大。磷酸酯,麟酸酯及次麟酸酯的酰化 AChE,

老化难易相差非常悬殊,在 R 及 R' 相同的系列中,磷酸化酶老化较慢,麟酸化酶较快,而次麟酸化酶不产生老化,但仍有自动恢复;至于不带

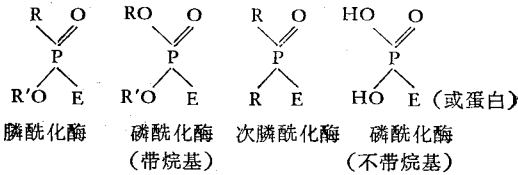
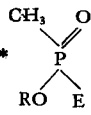


表 7 带环烷基的甲基磷酸化酶*的老化速度

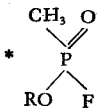
R	碳原子数	老化相对速度 (速度常数之比)	
		牛红血球 AChE	马血清 ChE
	3	<<1	<<1
	4	134	29
	5	103	33
	6	1	1
	7	11	22
	8	>200	>200



烷基的磷酸化酶的周转率却是非常高的。
烷氧基团的性质对去烷基化速度影响也很大。在甲基麟酸酯系列中,烷氧基团带有 α-仲碳原子的磷酸化 AChE 的老化反应普遍地比带

表 8 梭曼同系物*的几个能量参数的计算**^[19]

参 量	沙 林 (I) R = (CH ₃) ₂ CH—	化合物 (II) CH ₃ CH ₂ CCH(CH ₃)—	化合物 (III) (CH ₃) ₂ CHCH(CH ₃)—	梭 曼 (IV) (CH ₃) ₂ CCH(CH ₃)—
β-碳原子的净电荷分子最高已占轨道能量 (hartree)	-0.041	-0.0025	0.0145	0.0279
E _{HOMD} (kcal/mol)	-0.50934	-0.49426	-0.4873	-0.4820
	-319.62	-310.157	-305.80	-302.447
烷氧前线电荷密度	1.0834	0.9799	0.8459	0.5892
半老化期(小时)	2.4	0.47	0.2	<0.04



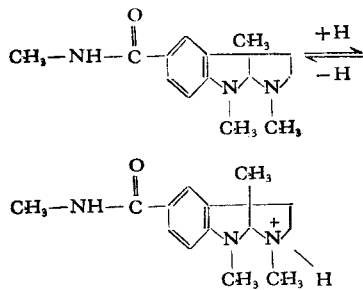
** 采用分子轨道理论的近似计算方法——CNDO/II 法,在 DJS-B 电子计算机上进行运算。

有 α -伯碳原子的膦酰化 AChE 快数十倍至千倍,而带支链者又比带直链者快。Benschop 等曾设计了一系列带有环烃氧基的有机磷化合物,研究其抑制的 ChE 的老化速度,表现了有趣的跳跃现象;如此规律的跳跃现象,在酶分子上一定有相应的结构基础。

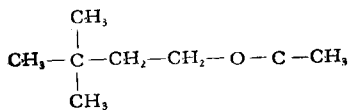
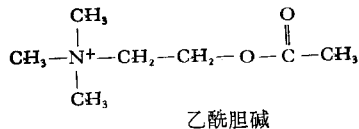
关于梭曼同系物的几个能量参数曾经由我们实验室吴加金同志进行过计算^[19],如表 11,从沙林到梭曼四个同系物的烷基依次递增一个甲基, β -碳原子上的净电荷和分子最高已占轨道能量也规律性地增大,烷氧前线电荷密度规律性地减小,与去烷基速度呈平行关系。由于计算值是有机磷化合物本身,而不是膦酰化酶上的膦酰残基,是否有内在的联系,尚不敢肯定。此外这些计算也没有考虑到毒剂对映体以及在溶液中的优势构象问题。

(4) 阴离子部位 很早就有人提出,ChE 活性区域还含有一个阴离子部位。下面的实验说明了它的存在。

依色林在 pH 小于 8 时呈季铵型,对 ChE 的抑制力强;而当 pH 大于 8 时,转化为叔胺型,抑制力明显下降。



Ach 的季铵离子带正电荷,而其电子等排物 (isostere) 3, 3-二甲基丁基乙酸酯不带电荷,因此,作为底物时,ChE 催化 Ach 分解的效率

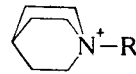


电子等排物

远高于其电子等排物。

阴离子部位可能是由门冬氨酸或谷氨酸的羧基构成的, AChE 阴离子部位的羧基呈解离状态,而 BuChE 的羧基不解离,或解离度很小,底物与 BuChE 阴离子部位的结合主要靠范德华力,假性 ChE 也称作范德华中心。

J. C. Kellett 等 (1965) 研究一系列具有不同离子半径的季铵离子与酶的阴离子部位的作用规律,发现当季铵离子具有高度对称性时,特别是具有致密形式时,亲和力最强。取代基以丙基最好,因而推论阴离子部位是一个能容纳大约 110—150 立方埃的小腔,腔内有一个点电荷,可与底物的阳离子基团相连接。



$\text{Pr}_3\text{N}^+-\text{R}$

非致密形式

动力学和热力学的研究还表明 AChE 可以生成三元复合物。它的自由能较低,也较稳定,即一个以上的配体对 AChE 同时发生作用:(1) 一个配体与已经以酰基共价结合到 AChE 活性部位的中间体再结合,例如磺酰化或磷酰化的 AChE,其阴离子部位还可以与一个阳离子配体结合,(2) 两个配体同时以非共价键与游离 AChE 的活性部位相结合。

三元复合物已用来研究酶的活性区域。一些带芳香族的阳离子象吡啶、喹啉及吲哚的衍生物都有很好的荧光性质,可以作为 AChE 活性区域的探针。这些芳香族阳离子与酶的阴离子部位结合时,比其它有机阳离子更会引起空间的变形,所以在三元复合物中具有惊人的性质差别。Shinitzky 等 (1973) 认为这些芳香族阳离子配体可以作为电子接受体与 AChE 催化部位中可作为供体的色氨酸吲哚侧链形成一个电荷转移复合体,伴随有芳香族基团荧光的淬灭,并在远紫外区出现一个新的吸收带。芳香族阳离子配体和酶的色氨酸吲哚环的最大距离约 5 埃,表明色氨酸残基与活性区域的阴离子部位非常接近。

(5) 疏水区 由 ChE 活性区域氨基酸的碳氢键所构成,具有明显的亲脂性质,在与底物或

抑制剂作用时，可以与其分子中的疏水基团结合，这种作用力属范德华引力。其实造成疏水作用的不是它，而是由于水的结构内没有容纳非极性残基的能力。同时它排斥亲水性基团，所以把亲水性酰基基团推向酯解部位，促进了反应的发生。

M. I. Kabachnik (1970) 年提出了 AChE 和 BuChE 活性区域疏水区的模式图，阴离子部位各有两个疏水区，酯解部位 AChE 有一个，BuChE 有两个。AChE A₂ 疏水区配体的最适链长为 6 个碳原子距离，BuChE 为 8—10 个；AChE B 疏水区配体的最适链长为 11 个碳原子距离，BuChE 为 7 个。

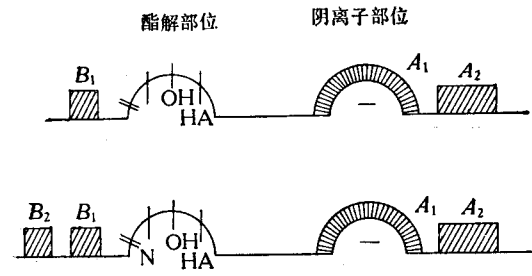


图 1 胆碱酯酶疏水区分布示意图

3. AChE 的分子型 AChE 的最小活性单位是亚基。又叫单体，呈球状结构，直径约 5nm^[9]，它具有完全的胆碱酯酶活性。现已确认，每个种属只有一种亚基^[10]，每个亚基只有一个活性部位，亚基是 AChE 最小的分子型。流体力学的研究和电镜的观察发现 AChE 还有更高级的结构形式，可以分成两大类，六种分子型。各分子型中的各个活性区域均独自起催化作用，并不受亚基间相互作用的影响：(1) 同一种属各型 AChE 的 Km 值及其对不同底物水解的相对速度一样^[11]；(2) 单体受过量底物抑制的程度和多聚型 AChE 差别也不大。

(1) 对称型(球型) 由不同数目的亚基叠加而成，在低盐溶液中不凝集。球型分子又分为单体 (G₁)、二聚体 (G₂) 及四聚体 (G₄) 三种，分别含有 1、2 和 4 个亚基；亚基内(三级结构)及亚基间(四级结构)都有双硫桥连接。

(2) 不对称型(尾型) 尾型 AChE 也是不同数目亚基的叠加物，但在低盐溶液中凝集。其

三种分子型四聚体 (A₄)、八聚体 (A₈) 及十二聚体 (A₁₂)，分别由 1 个、2 个及 3 个四聚体构成；每一个四聚体都附着一条宽约 2nm，长约 50nm 的小尾，尾的作用可能是 AChE 分子用来在膜上抛锚定位的。

AChE 分子型的多样性普遍存在于动物界 (表 9)，而且与亚细胞定位及生理功能的差异有相应关系。

表 9 不同种属 AChE 的分子型

分 子 型	电鳗电 器官 [9] [10]	牛颈 上节	人肌肉	大鼠 肌肉	鸡肌肉
		Bon, S. (1979)			
球型					
单体 G ₁	5.3S	4.8S	3.5S	3.5S	4S
二聚体 G ₂	7.7S	7.8S	6S	6S	6.5S
四聚体 G ₄	11.8S	10.5S	11S	9.9S	11.5S
尾型					
一个四聚体 A ₄	9S	8.7S	9.5S	8.8S	...
二个四聚体 A ₈	14.2S	13S	13.3S	13S	14.8S
三个四聚体 A ₁₂	18.4S	17S	16.7S	16.7S	20S

大白鼠肌肉中，只有终板区才有 A₁₂，非终板区没有此型。去神经后两周，A₁₂ 型从终板区消失，当肌肉重新被神经支配后，新建的终板区又重新出现 A₁₂。这种新建的终板区可以在原来的位置，也可以在其它部位，因而被称作终板型 AChE。人的肌肉不是这样，终板区及非终板区都有各种分子型 AChE 存在，即 A₁₂ 不一定只定位在终板区，其相对含量与生理状态也没有简单的对应关系；可是肌无力综合症患者的终板区却没有 A₁₂ 型。

J. P. Segret 等 (1972) 计算过，含 23 个氨基酸的肽链平均长度为 3.5nm，那么 50nm 长的小尾将含有大约 330 个氨基酸，其分子量应在 4 万左右。AChE 的尾部组成和结构已证明是胶原蛋白，它含有羟赖氨酸及羟脯氨酸，后者是胶原蛋白或胶原样蛋白所特有。胶原蛋白酶可以修饰尾型分子的尾部，使之转化为球型的 G₄。

(3) 凝集现象 红血球 AChE^[13]、电鳗或电鳐电器官 AChE^[11] 在低离子强度介质中发生凝集现象。凝集现象是尾型 AChE 的特征，从高

分辨电镜看到凝集物是数个不对称型分子“尾尾”相连,分子头部伸向两端而构成,但相连的尾部总长度小于单尾平均长度的两倍,故知两个尾部又是“边靠边”的连接方式^[9]。凝集的产生需要聚阴离子性凝集因子作为媒介。天然存在的内源性凝集因子很少量即可使纯化或未纯化的尾型 AChE 分子在数分钟内凝集。电器官粗制品中含有的凝集因子是使其 AChE 产生凝集所需量的 300 倍,亲和层析纯化 AChE 时,90% 以上的凝集因子被除去,而随着 AChE 被洗脱下来的那一小部分凝集因子已足够使它凝集。

电鳗和电鲛的 AChE 与凝集因子之间有交叉凝集作用,但形成的凝集物大小有差别,这取决于 AChE 及凝集因子双方。

内源性凝集因子不是蛋白质,而是一种耐热的大分子,它可经受 100℃ 煮沸,不被链霉蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白水解酶单独或伍用所消化,不被三氯醋酸破坏,不能穿过透析袋。它在高离子强度缓冲液中的沉降系数为 10S。凝集因子在伴刀豆球蛋白-琼脂糖凝胶上不被吸附,而这种凝胶是可以吸附甘露糖或葡萄糖的糖蛋白的。神经氨酸糖苷酶(又叫唾液酸苷酶)不能使凝集因子失活。脱氧核糖核酸酶及核糖核酸酶不能使之降解,但可被软骨素酶降解。凝集因子提取液经醋酸纤维素电泳呈现两个区带,分别为透明质酸及硫酸软骨素。现已确认后者即内源性凝集因子。外加硫酸软骨素形成的凝集物的沉降系数及电镜形态都与天然凝集物相同。

其它一些天然或人工合成的聚阴离子体也可以起凝集作用,说明凝集作用的专一性不强。含磷酸及硫酸的聚阴离子体最有效,它们要求的共性是多聚性质及带有负电荷,低聚阴离子或小分子阴离子无凝集作用。

AChE 的凝集对 pH 及离子强度的依赖性说明它受离子的相互作用控制^[11],蛋白质的带电集团必然参与这个过程。实际上,氨基的烷化,如用顺丁烯二酸酐,以负电荷取代正电荷基团,或用醋酸酐去中和它^[9],即便有凝集因子的

存在,都可以完全地阻止凝集。看来,正电荷,如 AChE 的赖氨酸残基,参与凝集过程中离子的相互作用。

AChE 是一种酸性蛋白质,因此其与聚阴离子性凝集因子相互作用的正电荷基团,必然限定在 AChE 分子的一个严格规范区域内,即尾部。凝集因子无论是天然的或者人工合成的都只能使尾型 AChE 凝集,而不能使球型 AChE 凝集。凝集发生在尾部,头都不参与凝集,因而不影响酶的活性。

凝集不因稀释而解凝,但在高离子强度介质中是可逆的。在等离子强度下,二价阳离子(Mg^{++} 、 Ca^{++})比一价阳离子(Na^{+})有更大的解凝作用。神经氨酸糖酐酶可使尾型 AChE 修饰成球型分子,使凝集物解凝。胶原蛋白酶也有相似的作用。胶原蛋白作用时,尾部有三个敏感点,即有温度依赖性的切割极限,目前对此还未能做作解释,可能是尾部存在着敏感性不同的化学键。光氧化反应可使凝集固定化,即在高离子强度介质中也不再解凝。这可能是通过活化尾部肽链中的组氨酸残基而产生了共价交联。这种反应在黑暗及无氧环境中都不发生。

总之,凝集现象及凝集因子的发现,对于 AChE 在生物膜上的定位及调控中都有重要意义,聚阴离子在一些生理现象中,如对分泌前的蛋白装填或微管蛋白在微管中的组装都起一定的调控作用。

三、生理状态对 AChE 活性的影响

机体内的 AChE 都是与生物膜结合在一起的,是天然的固相酶,只是人们在进行实验时,才使用有机溶剂、中性盐或者去污剂把它从膜结构上解脱下来,使之溶液化。由于在天然状态下与膜结合的 AChE 活性区域反折进去形成一个半封闭的囊腔,因此构成一个微环境^[14],具有一些不同于溶液化 AChE 的性质。微环境对活性区域的影响如下:

1. 缓冲系统和无缓冲系统中酶活性的差别
AChE 活性部位的囊状结构使囊内及附近区域形成一个非流动层。AChE 是一个周转率很高

的酶 ($TN = 1.6 \times 10^4 \text{ 秒}^{-1}$), 底物 Ach 的水解产生大量的乙酸, 堆积滞留在囊内。它们的排除依靠缓慢的扩散作用, 这样就在活性区域附近造成一个 pH 梯度; 愈靠近活性区域, pH 愈低, 远离活性中心的地方 pH 就高些。这样就可以产生几种情况(图 2) ①在有缓冲系统存在时, 膜结合 AChE 活性区域的 pH 梯度由于缓冲作用而消失, 在活性-pH 实验中呈现典型的钟形曲线。②没有缓冲系统时, 囊的外部 pH 虽已到达最适 pH 值, 而活性区域深处仍处在较低的 pH 状态; 必须当外界的 pH 更高时, 才表现出更大的活性来。③溶液化的 AChE 由于不存在膜的囊状结构, 没有微环境 pH 梯度, 无论有缓冲系统或者没有缓冲系统, 都表现出钟形曲线。这种现象在人工膜片上(木瓜蛋白酶火棉胶膜)已经得到复演。

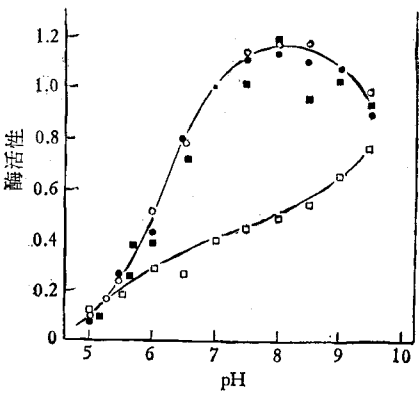


图 2 在有或无缓冲系统时膜结合 AChE 和溶液化 AChE 活性对 pH 的依赖性

- — □ 膜结合 AChE, 无缓冲系统
- — ■ 膜结合 AChE, 有缓冲系统
- — ○ 溶液化 AChE, 无缓冲系统
- — ● 溶液化 AChE, 有缓冲系统

2. 脂溶性底物和水溶性底物的差别 以水溶性乙酰胆碱或硫代乙酰胆碱 (AcTCh) 为底物时, 膜结合的 AChE 由于微环境效应造成底物浓度梯度, 酶活性明显地低于溶液化的 AChE, 而脂溶性底物靛酚乙酸酯 (IPA) 由于穿透力强, 可以穿透膜磷脂双分子层, 膜结合 AChE 表现出与溶液化 AChE 几乎相同的活性 (图 3)。

3. 抗原抗体络合物网络对酶反应的影响 用 11S AChE 的抗血清加入 11S AChE 中, 在室

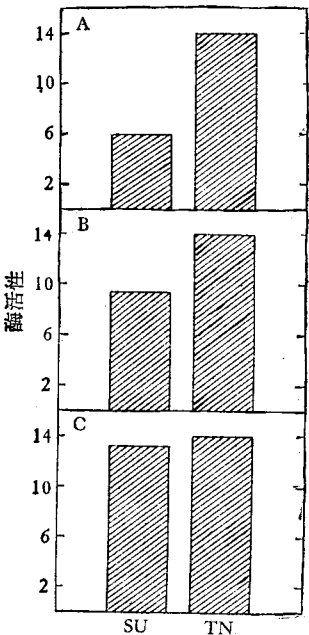


图 3 电器官匀浆膜结合 AChE 及溶液化 AChE 活性的差别

- SU 膜结合 AChE (0.33M 蔗糖制备的匀浆)
- TN 溶液化 AChE (0.5% TritonX-100—1M NaCl—0.05M tris, pH7.5 制备的匀浆)
- 底物 A——Ach, B——AcTCh, C——IPA

温作用 1—2 小时, 即可生成抗原抗体络合物的网络 (matrix), 表现为活性的降低 (图 3)。若把 AChE 和抗体的混合物在 4℃ 过夜, 而后离心分离出抗原抗体沉淀, 反复洗净, 再测活性, 发现沉淀比上清液中溶解态络合物对两种底物作用的差别表现得更为突出, 用靛酚乙酸酯基本上保留了活性, 而用硫代乙酰胆碱时, 几乎没有活性 (图 4), 这与膜的微环境造成的底物梯度的情况是一致的。

AChE 抗体被木瓜蛋白酶消化可获得 Fab 肽片, 此片段不与抗原产生沉淀, 但保留与抗原的结合能力, AChE 与 Fab 混合后, 由于其结合不形成网络, 不造成微环境, 没有穿透性的问题, 所以用靛酚乙酸酯及硫代乙酰胆碱都不表现出酶活性的降低。

以上实验说明, 微环境中 pH 及底物梯度的形成, 对膜结合的 AChE 的活性影响很大; pH 梯度可能是机体控制膜结合 AChE 活性的一种负反馈机制。

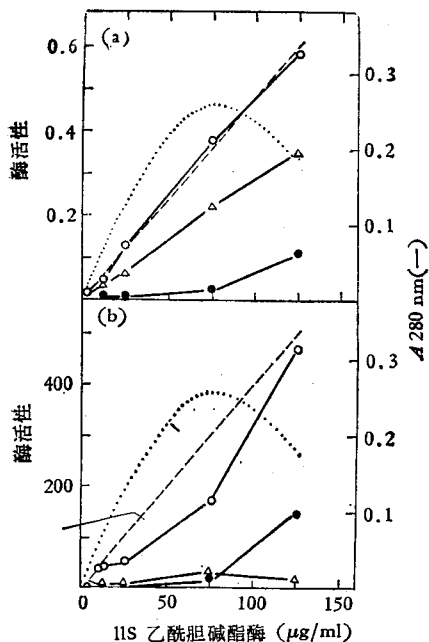


图4 抗原抗体络合物对AChE活性的影响

抗原 电鳗电器官 11S AChE
抗血清 家兔抗电器官 11S AChE 血清
(a) 二乙酰磷酸酯为底物
(b) 二乙酰硫胆碱为底物
○——○ 有抗血清时的酶活力
--- 无抗血清时的酶活力
●——● 有抗血清时上清液中的酶活力
△——△ 有抗血清时沉淀物中的酶活力
..... 沉淀曲线 (A_{280})

4. 静止态和活动态对中毒酶活性恢复的影响

磷酸化 AChE 生成后, 还会以几种不同的方式继续转化^[5], 老化是其重要转化方向之一, 这种转化受生理状态的影响很大。我们实验室发现, 1-甲基丙基甲基膦酸酯使大白鼠膈神经——膈肌标本的 AChE 磷酸化后, 在活动状态下(刺激神经间接引起膈肌收缩)的老化速度比在静止状态下(不刺激神经)快的多(图 5)。膈肌组织内的 AChE 实际上是膜结合的酶, 存在于突触前膜及突触后膜上。生物膜外表面的 AChE 的活性区域是半封闭的囊, 环绕活性区域的膜层形成一种微环境, 产生 pH 梯度, 电刺激增加神经末梢释放 Ach, Ach 的大量水解有可能在催化部位附近造成一个酸性环境, 质子可以促进磷酸化 AChE 的老化反应。这可能就是活动状态比静止状态老化快的原因。

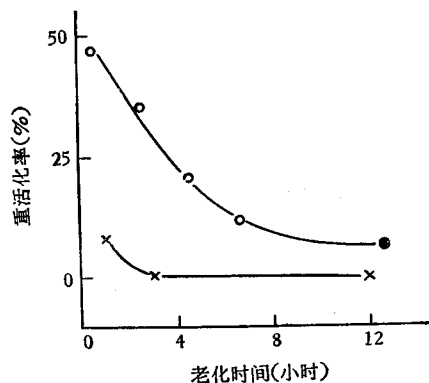
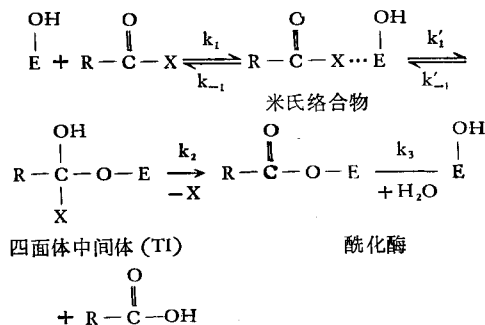


图5 1-甲基丙基甲基膦酸酯抑制的膈肌 AChE 在活动及静止状态下的老化速度

○——○ 静止状态
×——× 活动状态
抑制条件 $1\mu\text{g/ml}$, 30°C , 20 分钟
重活化 $10^{-3}M$ 氯磷定, 30°C , 20 分钟
底物 AChE, 7 微克分子
电刺激 11—12 次/分钟, 电压 2—9 伏

四、AChE 的催化作用

关于 AChE 催化反应动力学的研究, 近年来提出在米氏络合物和酰化酶之间, 还可能有另一个中间产物, 即诱导契合复合物。反应方程式如下:



这一复合物又叫做四面体中间体 (tetrahedral intermediate, 简称 TI), 具有如下的形式。

根据上式, T. L. Rosenberry (1975) 提出了一个 AChE 诱导契合模式图(图 7), 表明了各种活性基团、电荷接力系统及四面体中间体的存在。在低浓度 Ach 为底物时, 米氏络合物的生成是限速步骤 ($k_{-1} < k'_{-1}$); 在高浓度 Ach 为底物时, 去酰化反应是限速步骤 ($k_{cat} \cong k_3$), 限速步骤因底物及反应条件的变化而不同。AChE 亚基间没有协同效应, 但配体结合在周围部位可导致亚基内活性区域的别构效应。

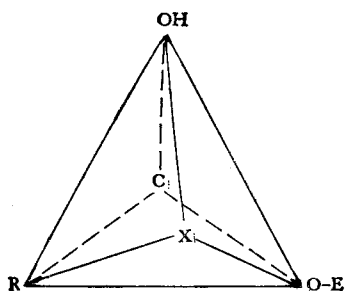


图 6 四面体中间体示意图

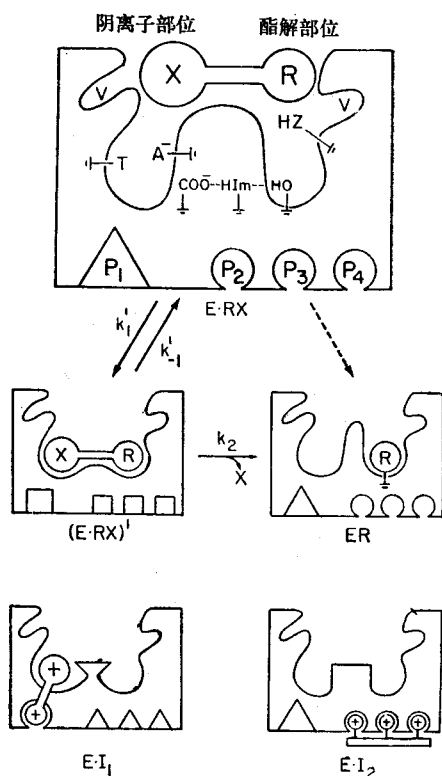


图 7 AChE 诱导契合机转的模式图

RX——底物 HZ——酸性基团 E·RX——米氏络合物 A⁻——阴离子部位 (E·RX)^I——中间体四面体 T——色氨酸 ER——酰化物 V——疏水区 COO⁻...HIm...HO——电荷接力系统 P₁—别构部位

五、AChE 的免疫学性质

1. AChE 抗原决定簇的专一性

当 AChE 反复从皮内、皮下或者肌肉注射给家兔以后,可以在数周至数月以后产生相当多的抗体。借助于免疫扩散反应,免疫沉淀反应以及微量补体结合试验可以观察 AChE 与同源及异源抗血清

间的反应情况。实验表明同一种动物各组织中的 AChE 或同一组织中各分子型 AChE 间,抗原抗体都有完全的交叉免疫反应。鱼类不同种属如电鳗和电鳐的 AChE 与抗血清间也有交叉反应,但 AChE 与同源抗血清反应时比异源抗血清滴度高,亲和力大。同类不同科的动物 AChE 间则仅有部分的交叉免疫反应^[17]。不同类动物的 AChE 间则完全没有免疫交叉反应^[16,18]。交叉免疫反应的出现,表明抗原除有相似的结构外,还有共同的抗原决定簇,部分交叉反应说明:抗原决定簇有一部分是相同的;至于完全无交叉反应,则表示具有完全不同的抗原决定簇。

表 10 乙酰胆碱酯酶与抗血清间的交叉免疫反应

抗原及抗体	交叉反应	文献
分子型间:		
电鳗 11S、14S + 18S AChE 与其抗血清	+	[16] Gurari, D.
电鳗 A ₈ 、A ₁₂ G AChE 与其抗血清	+	Rieger, F. (1973) Tsuji, s. (1972)
电鳗部分纯化 AChE ECH、ECHp 与其抗血清	+	[18]
组织间:		
小白鼠脑、红血球、肌肉 AChE 与抗小白鼠脑 AChE 血清 IgG ₀	+	[15]
牛脑、红血球 AChE 与其抗血清	+	[17]
种属间:		
电鳗、电鳐 AChE 与其抗血清	+*	Rieger, F. (1976)
大白鼠脑 AChE 与抗牛红血球 AChE 血清	±	[17]
牛尾状核、红血球 AChE 与抗电鳗 11S、14S + 18S AChE 血清	-	[16], Gurai, D. [1974]
电鳗 11S、14S + 18S AChE 与抗牛尾状核 AChE 血清	-	同上
与正常及非特异性抗血清间:		
电鳗部分纯化 AChE ECH、ECHp 与正常免血清	-	[18]
电鳗部分纯化 AChE ECH、ECHp 与抗牛两种球蛋白血清	-	[18]

实验方法:免疫扩散反应、免疫沉淀反应、微量补体结合反应及免疫火箭电泳。

* 电鳐 AChE 与两种抗血清形成小的、不易沉淀的凝集体。

2. 抗原抗体络合物 AChE 活性的变化 生物活性大分子产生的特异性抗体时, 这些大分子的作用非常不同。大多数情况下, 酶分子所产生的抗体对酶活性产生部分的或完全的抑制, 但有的反而使酶活性增高。这可能因为抗体的结合使酶的活性区域产生构象的变化, 抗体使酶分子稳定在最活跃的构象, 表现出激活作用, 反之, 则出现抑制效应。此外抑制作用的

产生也可能因为抗原抗体结合后, 限制了底物进入酶的活性区域或妨碍底物引起的诱导契合的发生。

AChE 抗体对 AChE 活性的影响是多样的^[15,16,18]。用水溶性底物 (ACh、AcTCh) 时, 一般都产生不同程度的抑制作用, 而正常兔血清及非特异性抗血清不出现抑制, 说明抗血清对 AChE 活性抑制的专一性^[16]。

表 11 胆碱酯酶抗原抗体络合物对酶活性的影响

络 合 物	对 AChE 活性抑制百分率(%)		文献
	水溶性底物	脂溶性底物	
电鳗 AChE + 电鳗 AChE 抗血清	40~80	0	[18]
小白鼠脑 AChE + 小白鼠脑 AChE 抗血清	50		[15]
小白鼠红血球 AChE + 小白鼠脑 AChE 抗血清	50		[15]
小白鼠肌肉 AChE + 小白鼠脑 AChE 抗血清	50		[15]
牛尾状核 AChE + 牛尾状核 AChE 抗血清	50		[16]
牛红血球 AChE + 牛红血球 AChE 抗血清丙种球蛋白	0		Michaeli, D. (1969)
牛尾状核 AChE + 正常兔血清	0		[16]
电鳗 AChE + 正常兔血清	0		Gurari, D. (1974)
电鳗 AChE + 电鳗 AChE 抗血清 Fab 片段	0	0	
电鳗 AChE + 牛球蛋白抗血清	0		[18]
马血清 ChE + 电鳗 AChE 抗血清	0		[18]
牛红血球 AChE + 电鳗 AChE 抗血清	0		[18]

D. Gurari 等 (1974) 以电鳗电器官球型 (11S) AChE 作为抗原, 在家兔获得了特异性抗血清, 并制备了免疫球蛋白的降解片段 Fab。实验表明, 当以 ACh 或 AcTch 为底物时, 抗血清的存在使 AChE 受到抑制, 而以 IPA 为底物时却不出现抑制 (图 4)。看来抑制不是由于直接结合在酶的活性区域, 而是由于限制了底物进入抗原抗体络合物的网络的缘故。用可以与抗原结合但又不产生沉淀的 Fab 片段进行实验, 无论以 AcTch 或 IPA 为底物都不抑制 AChE 的活性, 从而支持了这种看法。

由于抗原抗体络合物的微环境效应而导致的酶活性抑制在 AChE 特别明显, 因为 AChE 是一个周转时很短 (100 微秒) 反应很快的酶, 微环境所造成的 pH 梯度将严重的影响酶的活性。IPA 是一个脂溶性底物, 易于穿透抗原抗体络合物, 它又是一个分解速度较慢的底物 (比 ACTch 慢 3 个数量级), 因而减小了酶活性区域的 pH 梯度及扩散因素对酶活性的影响程度,

故不出现或只表现出轻度的抑制现象。

有的酶源却表现出不同的情况, 例如牛红血球 AChE 抗血清免疫球蛋白或其降解片段 F(ab')₂ 及 Fab 与 AChE 结合后, 以 AcTCh 为底物时, 都不影响 AChE 活性。表现在免疫沉淀物及上清液中的未凝集的免疫络合物均有 AChE 活性, 且二者活性的代数和与所加入的 AChE 活性相等, 还表现在抗原抗体络合物中的 AChE 和正常的 AChE 的米氏常数, 和分别以 AcTCh、PrTCh 为底物时的最大反应速度的比值没有明显的变化。

3. 抗体对 AChE 热稳定性的影响 抗体与抗原形成络合物后可以大大增强 AChE 对热处理的稳定性。D. Michaeli 等 (1969) 和 M. J. Holmes 等^[22]将牛红血球 AChE 与其抗血清球蛋白或酶降解的片段 F(ab')₂、Fab 相互作用后, 都可以使酶的稳定性明显高于正常 AChE (表 12), 甚至还可以使已经热变性的 AChE 部分地恢复酶的活性 (D. Michaeli 等 1969)。

使用正常血清球蛋白或其降解片段对 AChE 都起不到热稳定的作用,看来这种防止 AChE 热变性的作用也是专一性的。热稳定的机制尚不清楚;很可能是抗体与酶的抗原决定簇结合以后,使酶分子的空间构象更加稳定的缘故。

表 12 血清球蛋白降解片段对红血球 AChE 热稳定性的影响

降解片段 用量 (mg)	热处理后 AChE 活性丧失百分率(%)			
	抗牛红血球 AChE 血清		正常牛血清	
	F(ab') ₂	Fab	F(ab') ₂	Fab
1	51.6	...	92.4	...
2	46.3	25.8	...	98.0
3	21.7	...	91.4	...
4	11.5	11.0	...	98.1
5	2.9	...	91.3	...
8	...	12.5	...	99.7
AChE 活性对照		98.5		

六、结 束 语

AChE 在生理功能上的重要作用,引起了生物化学家的极大兴趣,而亲和层析的应用为生化研究所需要的高纯度的 AChE 的获得提供了新的方便途径。今后如采用物理的或化学修饰的方法对 AChE 结构及活性相互关系进行研究,将会有更深入的发展。

参 考 文 献

[1] Lenzinger, W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A., 57, 446, 1967.

[2] Rosenberry, T. L.: *Cholinesterases and Cholinergic Receptors* (Ed. Elsa, R.), *Proc. Intl. Meeting, Split, Croatica Chemica, Acta, Zagerb.* p. 235, 1975.

[3] 张兆耕、周廷冲:《军事医学科学院院刊》, 1980 年、第 3 期, 第 261 页。

[4] Morrisett, J. D. et al.: AD-713, 563, 1970.

[5] 孙曼霖、张兆耕、肖美珍、黄如衡、周廷冲:《军事医学科学院院刊》, 1980 年, 第 3 期, 第 251 页。

[6] 赵新如、孙曼霖、周廷冲:《军事医学科学院药理毒理研究所研究报告》。

[7] Fleisher, J. H., et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 14 641, 1965.

[8] Michel, H. O. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 121, 29, 1967.

[9] Cartaud, J. et al.: *J. Cell. Biol.*, 77, 315, 1978.

[10] Bon, S. et al.: *FEBS Lett.*, 71, 273, 1976.

[11] Massoulie, J.: *Eur. J. Biochem.*, 11, 441, 1969.

[12] 李凤珍、孙曼霖、周廷冲:《军事医学科学院药理毒理研究所研究报告》, 1979 年。

[13] Crone, H. D.: *J. Neurochem.*, 20, 225, 1973.

[14] Silman, I.: *Cholinesterases and Cholinergic Receptors* (Ed Elsa. R.) *Proc. Intl. Meeting, Split, Croatica Chemica Acta, zagreb.* p. 181, 1975.

[15] Adamson, E. D.: *J. Neurochem.*, 28, 605, 1977.

[16] Greenberg, A. J. et al.: *J. Neurochem.*, 29, 911, 1977.

[17] Trevor, A. J.: *Sym. Chol. Mech. Psychopharm.*, 1977.

[18] Williams, R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 62, 1175, 1969.

[19] 吴加金(1980 年, 未发表资料)。

[20] 王克琴、肖美珍、周廷冲:《军事医学科学院药理毒理研究所研究报告》, 1963 年。

[21] 许小珊、沈菊英:《军事医学科学院药理毒理研究室研究报告》, 1980 年。

[22] Holmes, M. J. et al.: *Immunochem.*, 10, 639, 1973.

[本文于 1980 年 11 月 12 日收到]

科技简讯

动物受惊反应监测仪

英国 Columbus 仪器公司研制了一种 II 型反应仪,可测量任何动物对突然刺激(声音或电刺激、光刺激等)的“受惊反应”。该仪器本身有“白噪声”发生器,能在刺激之前产生可调水平的背景噪声。如果在刺激之前给予较低强度的刺激—前脉冲,某些动物的反应是不同的。前脉冲的长度及其与真正刺激的间隔都是可调的。仪器本身的高功率放大器和扬声器能产生任何强度的声音刺激,最高可达 130 分贝。刺激频从 30

赫到 10 仟赫,连续可调。外部频率发生器或其它刺激源(如电击、喷气)也能通过反应仪 U 控制。刺激和间歇的幅度都可精确地测量,并能显示在数字显示仪上;每次刺激之后的结果由打印机打印出来。也可以根据编制的程序自动操作,同时打印出每个结果。这种仪器在测定动物“适应能力”的实验中可能颇有价值。

(摘自 *Nature*, 289, 110, 1981.)