

核 基 质

施 产 甫

(南京铁道医学院科研所)

四十年代以来,陆续有一些实验推论,真核细胞核内散布着一个由非染色质蛋白纤维组成的网络^[1]。这个核网络结构在七十年代初由 Berezney 和 Coffey 的实验室从大鼠肝细胞核中分离出来,定名为核蛋白基质或核基质^[2,10]。核基质经核酸酶处理一次后,即得核蛋白基质。所以核蛋白基质中 DNA 和 RNA 成份较之核基质要少一些,但蛋白质组成以及超微结构几乎没有区别。目前,人们多用核基质作材料进行研究。

分离纯化后的细胞核经多种生化处理和提洗[核酸酶消化、高浓度的盐缓冲液(2M NaCl)、非离子洗涤剂(Triton X-100或 NP40)]后,仍留下一个基本保持核外形和大小的残余核结构即核基质。它由下列四种成份组成:1.核孔-板层复合体。2.核仁的纤维状成份。3.散在分布于上述两者之间的网络样结构。它们是由细达 30—50 Å 的网络状纤维以及直径 80—100 Å 的颗粒状物质组成的形态不规则的网架。4.一些残余的染色质纤维。目前已知,在已试验的低等和高等真核细胞中,存在这种核基质结构^[3-6]。

以有丝分裂中期的细胞染色体为材料,使用高浓度盐提洗法或多聚阴离子(如硫酸糊精、肝素等)竞争取代法,可分离制备出染色体的骨架结构^[7,8]。在光镜下,它们保持良好的染色体外形。动粒、端粒以及染色体轴均清晰可见,周围则有呈放射状迸散开的 DNA 襻组成的晕圈。电镜下可见这些 DNA 襻的长度约为 20—30 微米,襻的基部附着在骨架结构上,襻的周缘区

上能见到呈串珠状排列的核小体。缓冲液的离子浓度显著地影响染色体骨架的外观,但这种改变多是可逆的。当用脱氧核糖核酸酶消化掉染色体骨架上迸散出来的 DNA 襻以后,其骨架蛋白质与核基质中蛋白质的变性凝胶电泳图谱十分相似,都有三条特征性的主蛋白带。

如果以间期细胞核为材料,仅用非离子去垢剂洗涤、高盐缓冲液(0.5 MMgCl₂)提洗,而省略核酸酶消化,则用蔗糖梯度离心即可分离出核幻影^[9]。核幻影虽在形态和生化组成上与核基质有较大差异,但却显示了细胞核中非膜性网络结构的存在。

核基质很可能参与真核细胞中 DNA 有序的空间排列,染色体 DNA 的包装、DNA 复制以及 hn RNA 的加工等多种重要的生物学功能,因而受到人们的重视。本文对近十年来国内外核基质的研究工作作一综述。

一、核基质的制备

最常用的核基质制备法是由 Berezney 等^[2,10]首先报道的。其主要步骤为:

1. 通过不连续的蔗糖梯度离心,分离出没有胞浆污染的,高度纯化的细胞核。

2. 细胞核用外源或内源的核酸酶消化,使大分子 DNA 有所降解,否则不易提洗。

3. 用低盐缓冲液(0.2mM MgCl₂, 10mM Tris, pH7.4)离心提洗三次(0℃, 780×g, 20分,洗去降解的 DNA(核小体和寡核小体)和部分的组蛋白及非组蛋白蛋白质。

4. 续用高盐缓冲液(2M NaCl 溶于低盐缓冲液中)离心提洗三次(0℃, 780×g, 40分)。以除去几乎全部的组蛋白、大部分非组蛋白蛋白质以及相当量的 DNA。

5. 使用去垢剂(1% Triton X-100 溶于低盐缓冲液中)提洗一次(离心条件同上)溶去核膜中所含的脂质成份。

6. 续用低盐缓冲液洗一、二次, 悬浮于低盐缓冲液中, 即是核基质。

7. 若将核基质再用脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶消化处理一次, 即可制备出核蛋白基质。

各实验室在用上述方法分离核基质时, 常有一些方法学上的修改, 如 NaCl 的浓度、去垢剂的选择、提洗顺序的变化以及蛋白酶抑制剂的选用等。

二、核基质的化学组成

在核基质的制备过程中, 由于所用的细胞材料、制备方法、特别是细胞核受 DNA 酶消化程度的差别, 核基质的化学组成便也有所不同。表 1 列举以大鼠肝细胞核为材料的核基质的化学组成。

1. DNA 按标准制备法制得的核基质, 其

表 1 核基质制备中各分部的化学组成和相对回收率

核 分 部	%回收率				%组成*			
	蛋白质	DNA	RNA	磷 脂	蛋白质	DNA	RNA	磷 脂
细胞核(对照)	100	100	100	100	69.0±1.78	23.9±1.66	3.4±0.14	3.7±0.24
低盐缓冲液 提洗分部	48.0±1.23	24.2±2.78	80.3±1.83	97.5±2.13	73.2±1.18	12.6±1.25	6.1±0.51	8.0±0.57
高盐缓冲液 提洗分部	16.3±1.17	2.4±0.21	34.0±1.64	93.6±1.65	68.0±2.02	3.4±0.37	7.1±0.55	21.4±1.78
核 基 质	10.0±0.57	2.3±0.21	29.0±1.68	2.2±0.51	80.8±1.38	6.5±0.72	11.7±0.90	1.0±0.26
核蛋白基质	9.8±0.55	<0.01	3.0±0.12	2.0±0.47	97.6±0.38	0.1	1.2±0.07	1.1±0.30

* 百分比组成: 假定各分部中蛋白质 DNA、RNA、磷脂的总和为 100%。

«引自 Bereznay, R.[2]»

DNA 含量为核 DNA 总量的 1—2%。这些小片段 DNA 由于受到了核基质蛋白质的保护而不受脱氧核糖核酸酶的攻击。核基质上的双链 DNA 长度在 2—22kb 之间, 波动范围较大。碱性琼脂糖电泳或碱性蔗糖梯度离心显示, 核基质上单链 DNA 的峰值为 1600 个碱基长度^[12]。可见核基质中的小片段 DNA 上散布着较多的缺口或裂隙。这样的 DNA 正是无细胞 DNA 合成系统中最适的引物/模板, 为 DNA 合成酶 α , 特别是 β 的最佳底物。使用无细胞 DNA 合成系统也确实证明了核基质中有 DNA 合成酶 α 及 β 的存在, 并且不必加入外源的 DNA 引物/模板^[13,14]。

2. 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析显示, 核基质中存在着约三十条蛋白带。其中特征性的三条主要蛋白带的分子量约为 62K、

66K 和 70K^[10]。由于各实验室在电泳方法上的差异, 对这三个主要蛋白带分子量的估计也有所差别。因之, Gerace 等^[15]建议使用符号 P₁、P₂、P₃ 来代替这三个主要蛋白质。

Hodge 等^[5]发现, 核基质中主要蛋白质的合成持续于整个细胞周期, 唯在 S/G₂ 期有所下降。以处在不同细胞周期的同步化细胞为材料分离出的核基质, 其蛋白质的含量也有所不同。若以腺病毒感染的 HeLa S₃ 细胞为材料, 则制备出的核基质上的蛋白成份便有显著的改变。Mitchelson 等^[4]报道, 从低等真核细胞 *Physarum polycephalum* 分离出的核基质在超微结构上与高等真核细胞的核基质相似, 但它的两条主要蛋白带的分子量为 23K 和 36.5K, 另有约 30—40 条的次要蛋白带, 因而与高等真核细胞核基质的蛋白组份有较大的差别。

可能由于在较长时间的核基质的制备过程中,含巯基的蛋白质之间形成了-S-S-桥连和聚合^[11]导致了核基质中残余蛋白质相互之间较致密的集聚和缠结,所以使用任何目前所知的不使蛋白质变性的缓冲液均不能使它们溶解和分开。除非使用烈性去垢剂 SDS,但 SDS 导致了蛋白质不可逆的变性。这就限制了对核基质中蛋白质成分的生化分析。Bekhor 等^[16]曾报道,核基质中的绝大部分蛋白组份可用含 5M 尿素、3M 氯化钠的缓冲液溶解,但未对溶解的蛋白成分作进一步的生化分析。

目前对核基质中蛋白成份的生化功能所知甚少。Allen 等^[17]报道,大鼠再生肝细胞的核基质中存在内源蛋白激酶的活性。这种蛋白激酶被认为涉及到 DNA 复制启动时至少某一个核基质蛋白成份的依赖 ATP 的磷酸化作用。Higgins 等^[18]报道鸟类红细胞核基质中有一内源的、被高浓度盐激活的蛋白酶。该酶很可能与 P_i 蛋白质有关,意义不明。他们推测它可能与细胞周期中核基质的装配和加工有关。核基质中含有 DNA 合成酶 α 和 β ^[13,14]。另外,本文作者证实^[14],核基质中有两个蛋白成份与 Werner 等^[19]发现的两个与 DNA 紧密联结的、碱稳定的蛋白质(分子量 54K, 68K)有免疫交叉反应。Werner 氏发现的蛋白质被认为很可能以共价键结合在 DNA 上,它们可能与 DNA 的高序化、DNA 复制等有关。所以认为这样的两个蛋白质也存在于核基质中。

已经制备了针对核基质中三条主要蛋白带的特异抗体^[20]。荧光免疫定位确定,这三个蛋白质位于间期细胞核的核膜内层-板层区,细胞质内极少或无。

3. RNA 核基质中有一定数量的 RNA 存在。³H-UTP 脉冲标记实验证实^[29],新合成的 RNA 首先附着在核基质中。另外, Kaufmann^[11]的工作指出,若在制备核基质的第二步,即纯化核的脱氧核糖核酸酶消化保温过程中,加入外源的核糖核酸酶,则制备出的核基质中的网状颗粒结构大为稀薄。很可能核基质中的某些 RNA 在核基质的蛋白质/DNA 复合体之间

起着某种联结和维系作用。对此的另一可能解释见下文。

若用超声波温和处理核基质,可将核基质进一步分部为基质蛋白部分和残余 RNP 部分^[10]。基质蛋白部分的化学组成主要为蛋白质(占 91.1%)和 DNA (占 8.4%)。残余 RNP 部分则含有核基质的绝大部分 RNA,它们在超微形态上属于核基质中直径 80—100 Å 的颗粒结构(RNP 颗粒)。

4. 磷脂类 核基质中有少量的磷脂存在。目前尚未见有人对此作进一步的分析。

三、核基质的可能生物学作用

1. 核基质中的蛋白成份作为间期染色质 DNA 的骨架或中期核染色体的骨架蛋白: 真核细胞内又细又长的 DNA 分子,必须经过有序的多级包装,才能为微小的核所容纳。间期核染色质是如此,分裂期染色体内更是如此。DNA 高序化所涉及的许多蛋白成份(可能还有 RNA)及其包装浓缩的机制,有许多方面至今仍不清楚。核基质在真核细胞中的普遍存在,使人们首先联想到,核基质中某些蛋白组份对于间期核内 DNA 有规律的空间构型起着维系和支架的作用,并可能参与 DNA 超螺旋化的稳定和高序化的进程,譬如染色体 DNA 的组装。Comings^[3]以小鼠睾丸细胞为材料,发现完整的联会复合体和性小泡密切地结合在核基质中。他们推测,这些与减数分裂有关的特殊结构中的蛋白纤维组成和核基质中的一样。

核基质于有丝分裂前期开始分散。推测于有丝分裂末期重新组装。

2. 核基质与基因活性的调控:

核基质对 DNA 有很高的亲和性,特别是 poly(dT) 顺序。推测富含“A-T”的染色粒(G 带)结合在核基质中^[21]。DNA 的复性动力学实验指出^[22],与蛋白质紧密结合的 DNA (核基质中的 DNA) 和可溶性 DNA (在核基质制备过程中离解到洗脱上清液中的、没有蛋白质附着的 DNA) 有区别。核基质 DNA 中不存在快速复性成份,因此完全是由单一顺序组

成的。 $Cot_{1/2}$ 值指出,可溶性 DNA 中确定缺乏某些核基质 DNA 中的顺序。Bekhor 等^[16]也报道,结合在核基质中的 DNA 的顺序与总体 DNA 有差异,并报道由小鸡网织红细胞分离出的核基质中,血红蛋白基因的顺序为总体 DNA 的 20 倍,提洗上清液 DNA 的 1000 倍。Robinson 等^[23]最近报道了更有说服力的数据。他们发现,卵清蛋白基因选择地结合在小鸡输卵管细胞的核基质中,而不选择地结合在小鸡肝细胞的核基质中。作为对照, β -珠蛋白基因并不在输卵管细胞中转录,其 DNA 顺序便没有在小鸡输卵管细胞的核基质中发现。Maundrell^[24]、Ross^[25]等也报道了相似的发现。由此看来,具有转录活性的结构基因顺序(已被证明的血红蛋白基因和卵清蛋白基因)能选择性地结合在被表达细胞的核基质中,而在不被转录的细胞株中则否。这个结论能否推广到其他结构基因身上,有待于更多的实验数据。这种核基质与特异基因顺序的选择性结合暗示,核基质中的某些蛋白质成分很可能与细胞分化以及基因的调控有关。

应该附带解释一下的是,近年有许多报道指出,具有转录活性的基因对 DNaseI 特别敏感而被切割。而以核基质为材料的实验又显示,转录的 DNA 顺序能选择地结合在核基质上。这两种观点似乎有矛盾,其实不然。一是有文献报道^[33],DNaseI 敏感位点的数量和分布情况与基因活性密切相关。基因不被表达时,这些敏感位点位于基因内及基因的下游区;当它能被转录时,DNaseI 敏感位点集中位于基因的上游区,且呈成簇分布。这说明,DNaseI 敏感位点不是固定的,而是伴随基因活性的变化而变化。特别是活性基因上游区成簇分布的 DNaseI 敏感位点,很可能是转录的开关装置。这从另一方面也暗示了染色质 DNA 的空间构型也是随细胞的分化和机能状态而变化的。二是活性基因能被 DNaseI 切割,并不说明它不能选择地结合在核基质上。从上述的实验数据中^[16,23-25]均可看出这一点。因此,合理的推测倒是,在基因的激活过程中引起了基因及其

附近的 DNA 区域空间构型发生了变化,于是—方面形成了基因上游区 DNaseI 敏感位点的成簇分布,另一方面使该基因附着在核基质中。核基质中某些蛋白质成份很可能参与 DNA 空间构型的变化并为之提供了稳定因素。

3. 核基质与 DNA 复制

脉冲标记实验显示^[12,26],新复制的 DNA 附着在核基质中。随着脉冲时间的延长,标记 DNA 逐渐分布到高盐提洗上清液及低盐提洗上清液中。如果短期脉冲后随之以长时期的“追踪”,则核基质中的绝大部分标记便被除去,据此 Pardoll 等^[26]提出了一个固定点的 DNA 复制模型(图 1)。根据此模式,与 DNA 复制有关的酶类和因子形成一个复制复合体并附着在核基质中。待复制的 DNA 链从复制复合体的进口槽处滑入,复制好的两条 DNA 链则由出口处源源“纺出”。

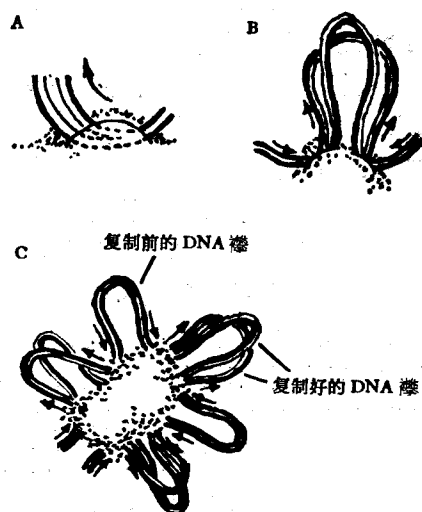


图 1 核基质上固定点的 DNA 复制模式图

A: 一固定点的复制复合体, DNA 复制时由此复合体“纺出”。B: 一对相邻的复制复合体,它允许 DNA 的双向复制。DNA 从复制复合体的两侧“纺入”,复制好的 DNA 链位于其间。C: 固定的复制复合体丝。

这个固定点 DNA 复制模式有如下几个特点: 1. DNA 的复制点(叉)是始终附着在核基质中的。2. 两个相邻的 DNA 复制复合体间的 DNA 形成一个襻,这种 DNA 襻很可能即是一个复制子单位。根据 Bereczney^[12]计算,大鼠

肝细胞核内有约 125,000 个附着在核基质中的 DNA 襻,其平均长度为 8 万个碱基对,相当于一个复制子的长度。Buongiorno-Nardelli^[27] 使用放射自显影研究多种动植物细胞株的复制子大小与 DNA 超螺旋襻的大小之间的相互关系的实验数据进一步证实了这个模型,并指出这种 DNA 襻在非复制时是以超螺旋状态存在的。

Biezunski^[28] 用电镜观察了果蝇 DNA 复性后形成的迴文结构后,发现成环迴文间的平均距离与染色粒的大小,复制子的平均大小以及 DNaseI 处理的核 DNA ‘domains’ 基本相当。他推测,成环迴文区为 DNA 复制的起始点,骨架蛋白可能特异地结合到成环迴文的单链 DNA 上,这些蛋白质的集聚导致了核内 DNA 的高序包装。结合有骨架蛋白的上 DNA 序列是能抵抗核酸酶攻击的。

Biezunski 的工作把成环迴文顺序,核基质蛋白质、蛋白质/DNA 复合物的联结、DNA 高序化、DNA 复制等几个十分重要而有兴趣的生物学课题有机地联系到一起,值得进一步探讨。

4. 核基质与 hnRNA 加工

³H-UTP 脉冲标记实验显示,新合成的绝大部分 hnRNA 形成 RNP 颗粒附着在核基质中。Miller^[29] 报道,当在制备核基质的过程中使用蛋白酶抑制剂(如甲磺酰氟苯 PMSF 或甲磺酰氯苯 PMSC),则所有快速标记的 hnRNA 均结合在核基质中,若不加入蛋白酶抑制剂,便有相当量的标记 hnRNA 解离下来。作为对照,纯化的 hnRNA 或 rRNA 在重组实验中不能选择地结合在核基质中。Herman^[30] 进一步指出, hnRNA 上的特异片段(双链区、polyA 区)很可能是 hnRNA 在核基质中的附着点。Ciejek^[31] 以小鸡输卵管细胞核为材料,在 -20℃ 低温条件下制备核基质,以降低内源核糖核酸酶的活性。他们发现,所有的卵清蛋白和卵粘蛋白 mRNAs 的前体(包括各级加工拼接中间体)以及所有的 rRNA 前体都仅存在于核基质中,而成熟的 mRNA 则无选择地分布于核基质和提洗上清液中。所有的 snRNA (核内小分子 RNA)——人们认为它们中的某些与 hnRNA

的加工有关——也同成熟的 mRNA 一样随意地分布在核基质及非核基质上清液中。由此认为,核基质是真核细胞核内 hnRNA 加工的地方。

四、存在问题与展望

自核基质被发现后的短短十年间,人们已从多方面对它作了研究,并取得了令人瞩目的成果。但也有一些资料对核基质和染色体骨架蛋白结构的真实存在提出疑问。有报道^[4,32] 指出,骨架样去蛋白染色体结构受离子浓度,提洗液组成及铺展方法的强烈影响。Hadlaczkzy 等^[3] 报道,若在制备染色体骨架结构的过程中于各提洗液中加入 5% 的蔗糖以抑制蛋白质的凝聚(加入蔗糖并不能提洗掉任何额外的蛋白质),则产生一个十分疏松的结构,缺乏骨架特征性外观。因此认为骨架是由蛋白质凝聚而产生的人为假象。Kaufmann 等^[11] 报道,微小的核基质分离顺序的改变可引起残余核结构超微形态的显著变化。若用外源的脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶共同消化纯化的细胞核,则核基质中的网状颗粒结构显著减少,残余核仁缺如。在促进蛋白分子间-S-S-桥形成的条件下(如阳离子洗涤剂,核温育过夜,氧化剂如连四硫酸钠的处理等),非染色质核基质成份便大大增加。反之,在减少蛋白质 SH 基氧化的条件下,分离的核基质中网络成份便稀薄。所以他们认为蛋白质分子间-S-S-桥的形成导致了某些核内蛋白成份不溶于高盐缓冲液。虽然核基质中蛋白成份的量会随提取条件的变化而有波动,但它们的凝胶电泳图谱并无明显变化。在 1982 年 1 月于西德海德堡市举行的世界性核基质专题讨论会上,学者们对核基质究竟是否客观存在进行了激烈的研讨,虽未能统一见解,但与会的多数学者认为虽然蛋白质的-S-S-桥连程度对核基质的超微形态和蛋白质含量有所影响,核基质并不是一个人为的假象。

围绕核基质问题的更深入细致的工作极为重要。首先是要提出更有说服力的数据来论证核基质的客观存在性。另如核基质中蛋白成份

的生化 and 酶学检定、蛋白质和残余 DNA 相互结合的方式、更多的特异结构基因顺序在核基质中的检测等,将是未来几年的进一步研究方向。

参 考 文 献

- [1] Agutter, P. S., et al. *J. Cell Sci.*, **44**, 395, 1980.
- [2] Berezney, R. et al. *Adv. Enz. Reg.*, **14**, 63, 1970.
- [3] Comings, D. E., et al. *Exp. Cell Res.*, **103**, 341, 1976.
- [4] Mitchelson, K. R., et al. *J. Cell Sci.*, **39**, 247, 1979.
- [5] Hodge, L. D., et al. *J. Cell Biol.*, **72**, 194, 1977.
- [6] Plagens, U. *Chromosoma*, **68**, 1, 1978.
- [7] Adolph, K. W. et al. *Cell*, **12**, 805, 1977.
- [8] Hadlaczky, G., et al. *Chromosoma*, **81**, 557, 1981.
- [9] Keller, J. M., et al. *Science*, **193**, 399, 1976.
- [10] Berezney, R. *J. Cell Biol.*, **85**, 641, 1980.
- [11] Kaufmann, S. H., et al. *Exp. Cell Res.*, **132**, 105, 1981.
- [12] Berezney, R., et al. *Exp. Cell Res.*, **132**, 1, 1981.
- [13] Smith, H. C., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1541, 1980.
- [14] Shi Chanpu. Dissertation, universität Heidelberg 1982.
- [15] Gerace, L., et al. *Cell*, **19**, 277, 1980.
- [16] Bekhor, I., et al. *Biochemistry*, **18**, 609, 1979.
- [17] Allen, S. L., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 111, 1977.
- [18] Higgins, L. L., et al. *J. Cell Biol.*, **79**, 132a, 1978.
- [19] Werner, D., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 243, 1980.
- [20] Gerace, L., et al. *J. Cell Biol.*, **79**, 546, 1978.
- [21] Comings, D. E., et al. *J. Cell Sci.*, **34**, 233, 1978.
- [22] Gates, D. M., et al. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1617, 1979.
- [23] Robinson, S. I. et al. *Cell*, **28**, 99, 1982.
- [24] Maundrell, K., et al. *Exp. Cell Res.*, **136**, 435, 1981.
- [25] Ross, B. A., et al. *Biochemistry*, **21**, 764, 1982.
- [26] Pardoll, D. M., et al. *Cell*, **19**, 527, 1980.
- [27] Buongiorno-Nardelli, M., et al. *Nature*, **298**, 100, 1982.
- [28] Biezunski, N. *Chromosoma*, **84**, 87, 1981.
- [29] Millen, T. E., et al. *J. Cell Biol.*, **76**, 675, 1978.
- [30] Herman, R., et al. *J. Cell Biol.*, **78**, 663, 1978.
- [31] Ciejek, E. M., et al. *Biochemistry*, **21**, 4945, 1982.
- [32] Comings, D. E., et al. *J. Cell Biol.*, **83**, 150a, 1979.
- [33] Elgin, S. C. R. *Nature* **300**, 402.

(本文于1983年3月16日收到)

蛋 白 水 解 酶 催 化 肽 键 合 成

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白水解酶催化蛋白质肽键的水解平衡常数很大,也就是说,这类酶促反应是趋向肽键水解方向的,但是,是否可以利用蛋白水解酶在不同的条件下催化逆向的反应合成肽键呢?这曾经一度吸引过多肽化学家们的兴趣。最早是在1937年, Bergmann 和 Fraenkel-Conrat 成功地用木瓜蛋白酶等细胞内蛋白水解酶催化乙酰氨基酸和氨基酸酰替苯胺的缩合^[1]。这给人们带来了实现这种逆反应的希望。接着 Bergmann 和 Fruton 又发现消化道酶,如胰凝乳蛋白酶也有催化肽键合成的能力,而且可以在生理pH条件下进行^[2]。这样,在一段时间内,人们

以为体内蛋白质合成可能也有一条通过蛋白水解酶的作用进行的途径。为此, Borsook 专门综述了多肽键水解平衡的知识。但是,随着核酸和蛋白质研究的迅猛进展,认识到体内蛋白质合成是一个由 DNA 决定的,在核糖核蛋白体上进行的过程。顿时,对蛋白水解酶酶促肽键合成的兴趣陡然下降。五六十年代是人工合成多肽最兴旺的时期,但多肽化学家的全部努力几乎都集中在液相或固相的化学合成上,并没有对蛋白水解酶的应用给予重视。不过在美国的一二家实验室内,在有限的课题上,如蛋白水解酶抑制剂的结构与功能关系、合成类蛋白的反