

北京鴨胚胎發育過程中 含硫氨基酸的代謝*

蛋氨酸及胱氨酸在孵化種卵中的分佈及變化

周 啓 琇

蛋氨酸與胱氨酸在動物肝與腦中的含量較其他組織器官稍高^[1]。其中蛋氨酸是甲基的供給者,它參與胆鹼的形成。據 Коштоянц 等人研究的材料^[2]說明硫氫基在神經活性方面有着突出的作用。可見胱氨酸在腦代謝與其他過程相協調的氧化還原反應中起着重要的作用。此外蛋氨酸與胱氨酸在含硫氨基酸的轉變機構中以及在體內其他甲基化物的形成中佔有重要地位^{[3][4]}。並且已知甲基移換作用和脫硫作用均在肝臟中進行。

從家禽的胚胎發育過程中來研究含硫氨基酸的代謝比較方便,並且分析腦與肝中含硫氨基酸的含量在發育過程中的變化,更能很好地說明這些臟器在含硫氨基酸代謝中的重要性。同時文獻中關於胚胎化學的研究多以雞為材料^[5]。今特選北京鴨為研究對象^[6]。北京鴨為較純的品種,亦有極大的經濟價值。就北京鴨的胚胎發育,進行生物化學的研究。最終也必然會對生產實踐有所裨益的。

材 料 與 方 法

本研究係分析北京鴨胚胎發育過程中,蛋白,蛋黃,蛋殼膜以及胚胎的腦與肝等五部分中蛋氨酸,胱氨酸和總硫量的變化。因為北京鴨孵化過程一般為 27 天,並且在前十天發育較慢,因此為了肝與腦的取樣方便起見,本研究分為孵化前,孵化時期中的第 14 天,第 18 天,第 22 天,第 27 天五個階段進行。

取 10 個未孵化的新鮮種卵進行分析。首先將潔淨的種卵置蒸餾水中煮沸 30 分鐘,取出晾乾(經過煮沸重量損失不超過 3%)。然後仔細剝離各部分,用濾紙將表面水分吸盡,然後分別秤其濕重。一般秤取濕重 1 克的物質進行分析。蛋殼膜濕重小於 1 克者,則全部用來分析。孵化期間各取五個樣本分析。分析結果都以濕重作底數,分別求得蛋氨酸,胱氨酸或總硫量的毫克%。

* 本研究論文係北京大學沈同教授所指導的。

一、蛋白質的水解:按照 ДМИТРИЕВ 法^[1]進行。取樣本 1 克置 50 毫升試管中,加入 20% HCl 20 毫升,放高壓釜中於 3 個大氣壓下水解 3 小時,冷後將水解液稀釋成 50 毫升,然後移入乾燥錐形瓶中,加適量高嶺土脫色,振搖後靜置片刻,過濾,收集濾液於錐形瓶中,保存待分析。

二、蛋氨酸的定量:按照 Hess 和 Sullivan 修改法^[7]進行。此法係根據蛋氨酸與氧化劑亞硝酸鐵氰化鈉作用產生黃色,酸化後呈紅色。許多其他化合物雖亦與該氧化劑呈有色反應,但均係在鹼性情況下產生。此法用光電比色計可測至 20 PPM。本文作者曾用已知量蛋氨酸加樣品水解液作收回試驗,收回率可達 97%。

三、胱氨酸的定量:按照 Folin 和 Looney 法^{[8][9]}進行。此法係根據氨基酸中只有胱氨酸與尿酸試劑可產生藍色。胱氨酸的收回率經測定可達 98.6%。在這個分析中沒有分別對胱氨酸與半胱氨酸來加以分析。

四、總硫量的測定:按照 Benedict Denis 法^{[1][10]}進行。此法係根據在硝酸銅和氯化鈉的存在下,可使生物學物質中的硫轉變為硫酸鹽,然後與硫酸鋇作用以得到硫酸鋇的沉澱,再根據硫酸鋇的重量來計算其中的含硫量。此法收回率可達 94%。

本實驗中蛋黃,腦和肝在水解前均未事先除去脂肪,事實上在直接用酸水解的過程中,脂類均被析出呈蠟狀浮於液面,很易除去,不妨礙分析。

分 析 結 果

I. 蛋氨酸及胱氨酸在蛋殼膜,蛋白及蛋黃中含量的變化

表 1. 北京鴨胚胎發育過程中蛋殼膜,蛋白及蛋黃的變化
(濕重,蛋氨酸,胱氨酸及總硫量濃度的變化)

孵 化 天 數		孵 化 前	14	18	22	27
分析所用的鴨蛋數		10	5	5	5	5
蛋 殼 膜	濕 重 (克)	0.85±0.02*	0.77±0.04	0.70±0.02	0.64±0.01	0.60±0.01
	蛋氨酸(毫克%)	731±28.8	715±3.7	676±6.3	625±4.0	538±6.2
	胱氨酸(毫克%)	5459±61.8	4610±27.4	4260±30	3830±14.7	3620±34.7
	總硫量(毫克%)	1675±21.6	1410±30.7	1285±54.8	1165±58	1080±14.1
蛋 白	濕 重 (克)	36.3±0.96	17±0.20	14.7±0.79	1.5±0.15	0
	蛋氨酸(毫克%)	620±15.6	800±12.9	460±22.8	450±22.4	0
	胱氨酸(毫克%)	384±6.3	820±7.2	800±19.1	724±18.4	0
	總硫量(毫克%)	395±12.0	862±2.8	765±13.0	692±9.1	0
蛋 黃	濕 重 (克)	29.2±1.08	30.2±0.76	25.2±0.75	21.2±0.53	6.0±0.33
	蛋氨酸(毫克%)	440±16.0	380±7.0	320±13.8	190±4.3	200±1.5
	胱氨酸(毫克%)	385±17.1	366±4.2	425±3.0	445±2.3	425±8.5
	總硫量(毫克%)	319±11.5	290±3.1	316±6.0	270±4.0	264±1.8

* ±0.02 係根據 $\sqrt{\frac{\sum D^2}{N(N-1)}}$ 式計算所得標準差,餘類推。

由表 1 可見鴨蛋孵化 14 天以前蛋黃消耗極少, 孵化 22 天後蛋白全部用完, 並且此後蛋黃的利用顯著增加。應該指出孵化前蛋白中蛋氨酸, 胱氨酸和總硫量的百分含量反而較孵化後者為低, 這是因為在孵化期間蛋白中水分減少所致。

表 2. 北京鴨蛋殼膜在孵化前及孵化後(孵化 27 天)的比較^[1]

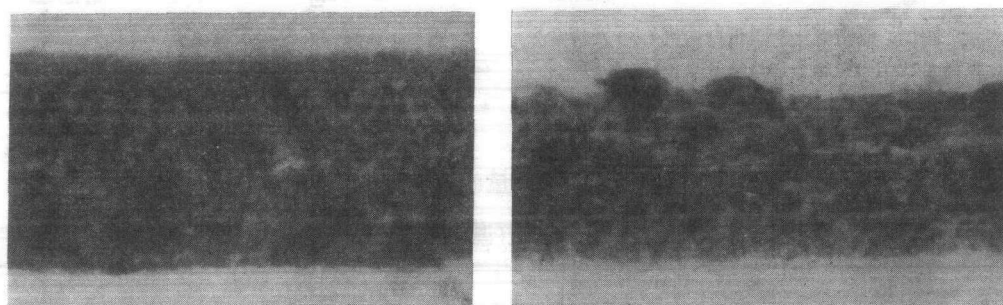
	濕 重 (克)	蛋 氨 酸 (毫克%)	胱 氨 酸 (毫克%)	總 硫 量 (毫克%)	蛋 氨 酸 (毫克)	胱 氨 酸 (毫克)	總 硫 量 (毫克)	總 氮 量 ^[2] (%乾重)	蛋氨酸含硫量(S_m) 胱氨酸含硫量(S_c)之和佔總硫量(S)之百分率 $\frac{S_m+S_c}{S}\%$ ^[3]
孵化前	0.85±0.02	731±28.8	5459±61.8	1675±21.6	6.28±0.26	46.44±1.49	14.17±0.04	15.75	100
孵化後	0.60±0.01	538±6.2	3620±34.7	1080±14.1	3.24±0.01	22.74±1.37	6.59±0.16	15.54	102
差 別	-0.25	-193	-1839	-595	-3.04	-23.7	-7.58		
差別%	-29%	-26%	-34%	-36%	-48%	-51%	-53%		

[1] 孵化前及孵化後各用 5 個鴨蛋蛋殼膜分析, 以分析結果的平均數作比較。

[2] 用真空乾燥 5 小時的樣品分析孵化前蛋殼膜含水分 53.18% 孵化 27 天(尚未破殼者)者含水分 16.41%。

[3] 蛋氨酸含硫 21.47%, 胱氨酸含硫 26.67%。

由表 2 看出鴨蛋在孵化期間蛋殼膜的含硫氨基酸的量亦在不斷降低, 這種現象亦可由圖一中顯然看出。根據總氮濃度和 $\frac{S_m + S_c}{S}\%$ 值可以說明蛋殼膜純為蛋白質。



未經孵化的鴨蛋蛋殼膜空隙少

孵化 27 天的鴨蛋蛋殼膜空隙較多; 且變薄。

圖一. 北京鴨蛋殼膜*橫切片顯微鏡照相(石蠟製片厚度為 15 μ 伊紅染色)

鴨蛋孵化期間蛋氨酸總量, 胱氨酸總量及總硫量的變化在蛋白中的情況見圖二; 在蛋黃中的情況見圖三。比較圖二及圖三, 則可以看到下列幾個情況:

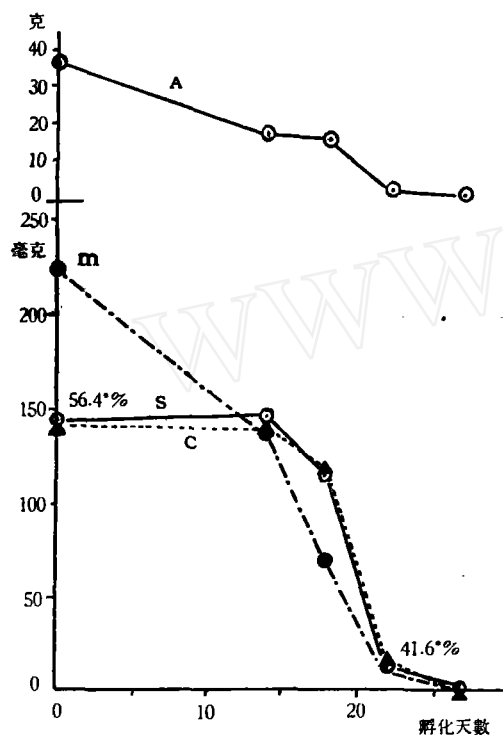
一、蛋白中所具有的含硫氨基酸的絕對量大於蛋黃中的含量。

二、蛋白中的蛋氨酸量在孵化早期即開始減少, 而蛋黃中的蛋氨酸以及蛋白蛋黃中的胱氨酸與總硫量均在孵化第 18 天後才開始減少。

三、蛋白蛋黃中的蛋氨酸及胱氨酸所含硫之和僅為總硫量的 41.6%—62.0%。在

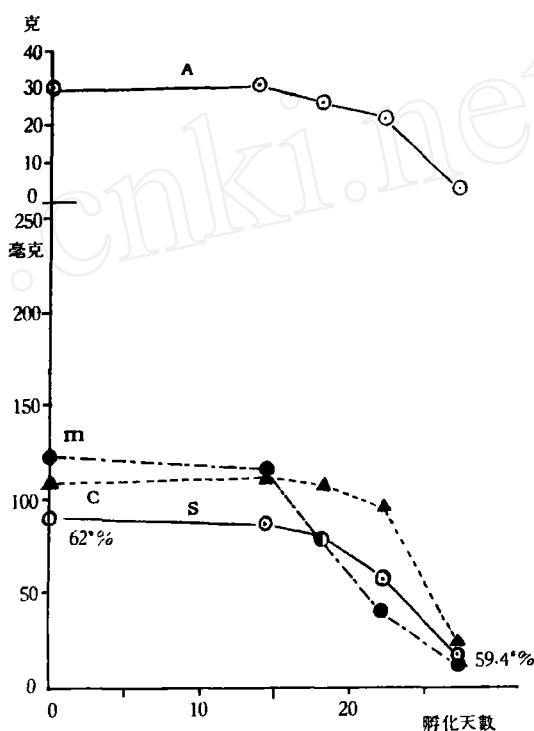
* 所取蛋殼膜係未經加熱處理的。

孵化過程中這些比例數值有減少的趨勢。



圖二. 鴨蛋孵化期間蛋白濕重(A)及所含總硫量(S), 蛋氨酸量(m), 胱氨酸量(C)的變化。

* 為 $\frac{S_c + S_m}{S}$ % 數值



圖三. 鴨蛋孵化期間蛋黃濕重(A)及所含總硫量(S), 蛋氨酸量(m), 胱氨酸量(C)的變化。

* 為 $\frac{S_m + S_c}{S}$ % 數值

II. 蛋氨酸及胱氨酸在胚胎腦及肝中含量的變化

表3. 北京鴨胚胎發育過程中腦及肝的變化(濕重, 蛋氨酸, 胱氨酸及總硫量濃度的變化)

孵 化 天 數		14	18	22	27
分 析 所 用 的 鴨 蛋 數		5	5	5	5
胚 胎 腦	濕 重 (克)	0.20 ± 0.002	0.77 ± 0.04	0.94 ± 0.014	1.10 ± 0.017
	蛋氨酸 (毫克%)	100 ± 1.4	465 ± 3.8	650 ± 3.2	1680 ± 12.8
	胱氨酸 (毫克%)	705 ± 4.8	759 ± 4.1	668 ± 3.4	599 ± 9.2
	總硫量 (毫克%)	1300 ± 26.3	1250 ± 30.8	1270 ± 35.4	2025 ± 34.3
胚 胎 肝	濕重 (克)	0.1 ± 0.001	0.36 ± 0.016	0.70 ± 0.025	1.34 ± 0.014
	蛋氨酸 (毫克%)	200 ± 4.4	553 ± 19.2	1850 ± 19.5	1910 ± 12.0
	胱氨酸 (毫克%)	805 ± 5.0	424 ± 6.9	121 ± 4.1	150 ± 2.6
	總硫量 (毫克%)	2030 ± 31.5	750 ± 8.3	880 ± 7.3	755 ± 6.9

由表3看出腦在孵化18天以前濕重增加甚快, 而18天以後濕重增加緩慢下來。肝的濕重在孵化後期增長較快。並且腦中胱氨酸的百分含量較肝中為高, 而肝中蛋氨酸

酸的百分含量則較腦中為高。

胚胎腦及肝中所含蛋氨酸量, 胱氨酸量及總硫量在胚胎發育過程中的變化見圖四及圖五。圖中表明了下列幾個情況:

一、胚胎腦濕重的增加在孵化的 18 天以後緩慢下來, 但是蛋氨酸量及總硫量依舊是很快地增加, 這說明胚胎腦中的代謝過程還是很旺盛的。

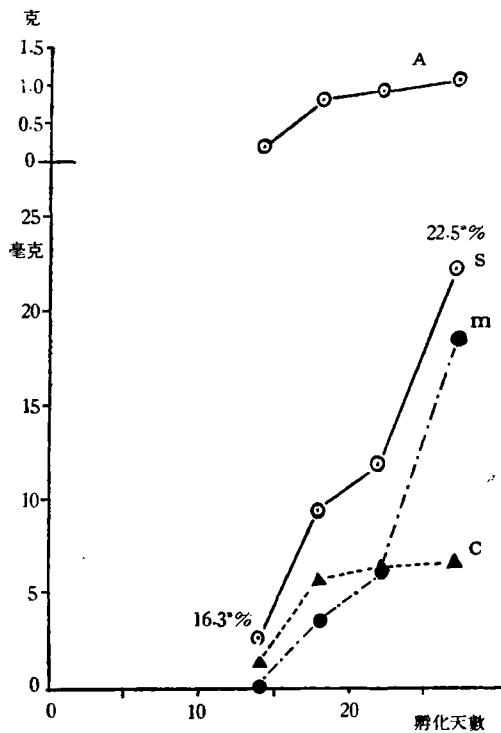
二、胚胎肝中的蛋氨酸量及總硫量也是增長得很快。

三、腦和肝中的胱氨酸量都比蛋氨酸來得少, 並且增長得很慢。腦和肝的情況也還有區別: 腦中胱氨酸含量較多, 並在胚胎腦的發育早期有顯著的增長; 至於胚胎肝中的胱氨酸量則甚少, 亦沒有明顯增長的情況。

四、胚胎肝中蛋氨酸與胱氨酸所含硫量之和僅為總硫量的 32% (孵化的第 18 天) 和 60% (孵化的第 27 天), 在胚胎發育過程中此比例值有明顯的增長。

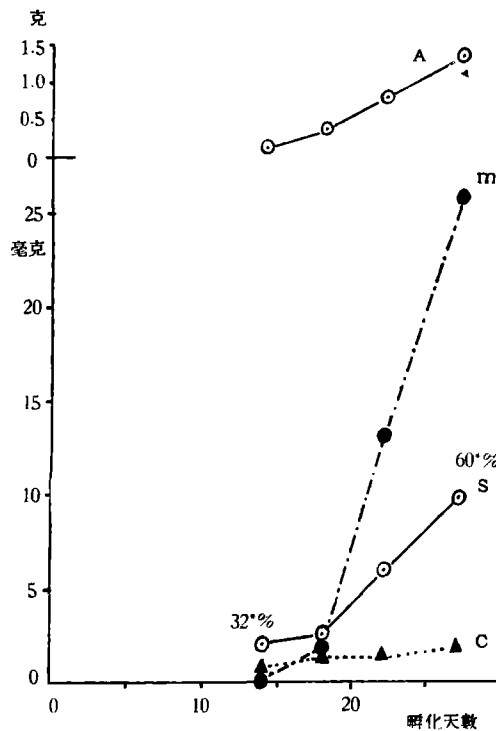
五、胚胎腦中蛋氨酸與胱氨酸所含硫量之和僅為總硫量的 16.3% (孵化的第 18 天) 和 22.5% (孵化的第 27 天), 在胚胎發育過程中此比例值的增長不如肝的明顯。

六、這個 $\frac{M_s + C_s}{S}$ % 的數值在胚胎腦及肝的情況下都比在蛋白蛋黃的情況下為低。



圖四. 北京鴨胚胎發育過程中腦的濕重(A)及所含總硫量(S), 蛋氨酸量(m), 胱氨酸量(C)的變化。

* 為 $\frac{S_m + S_c}{S}$ % 數值



圖五. 北京鴨胚胎發育過程中肝的濕重(A)及所含總硫量(S), 蛋氨酸量(m), 胱氨酸量(C)的變化。

* 為 $\frac{S_m + S_c}{S}$ % 數值

討 論 及 總 結

在北京鴨的胚胎發育過程中,腦和肝中的含硫氨基酸及總硫量均逐漸增加,同時蛋白,蛋黃中的蛋氨酸,胱氨酸及總硫量均顯著降低,可見其為胚胎器官中含硫氨基酸的直接來源。但是第 27 天腦中蛋氨酸總量僅為蛋白及蛋黃中蛋氨酸減少量的 5.3%,肝中者佔 7.45%。可見尚有大量蛋氨酸分佈到肺,腎,肌肉等其他組織器官中,或轉變為其他物質。並且腦中胱氨酸總量僅為蛋白和蛋黃中胱氨酸減少量的 2.62%,肝中者佔 0.84%。所餘大量胱氨酸推測分佈在羽毛,肌肉,血液以及其他組織器官中。同時腦中蛋氨酸和胱氨酸的代謝不同,從 14 天以後,蛋氨酸的含量幾成直線上升,而胱氨酸的變化不大。肝中情形亦相似,不過從 18 天以後蛋氨酸的含量才開始迅速上升(見圖四,圖五)。從計算蛋氨酸及胱氨酸所含硫之和與總硫量的比值 $\left(\frac{M_s + C_s}{S}\right)$,亦顯示了鴨蛋在孵化過程中硫代謝的一些情況:胚胎中的硫代謝與蛋白蛋黃中的硫代謝不同,前者 $\frac{M_s + C_s}{S}$ 值隨孵化過程而有升高,後者則略有降低。胚胎腦與胚胎肝亦不盡相同。此外在孵化期間蛋殼膜中含硫氨基酸的量亦有損失(見表 2),可見蛋殼膜與胚胎發育過程中的硫代謝有關。並且應該指出蛋殼膜中含有多量胱氨酸,約佔濕重的 5.46%,這也是值得注意的。

致謝 本研究報告中所附蛋殼膜切片的顯微鏡照相係李永生同志所作,特此致謝。

參 考 文 獻

- [1] Дмитриев В. Ф.: (1955) Биохимия 20:527.
- [2] Коштоянц Х. С.: (1951) Изв. АН СССР, сер. биол. Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция № 2:170.
- [3] Браунштейн А. Е.: (1949) Изв. АМН СССР. Биохимия аминокислотного обмена 237—233.
- [4] Mcelroy W. D. and Glass H. B.: (1955) Asymposium on amino acid metabolism 558—590.
- [5] Needham J.: (1931) Chemical Embryology II. 1059.
- [6] Бордзюловская Н. П.: (1955) Изв. АН Украинской ССР Киев. К биологии развития сельскохозяйственных птиц. Эмбриональное развитие уток 3—30.
- [7] Millard J., Horn D., Jones D. B. and Blum A. E.: (1946) J. Biol. chem. 166:313.
- [8] Folin O. and Looney J. M.: (1922) J. Biol. chem. 51: 421—434.
- [9] C. A. 6 3433 (1922).
- [10] Benedict, Denis: (1930) J. Biol. chem. 86: 285.

METABOLISM OF SULFUR-CONTAINING AMINO-ACIDS IN DEVELOPING EMBRYOS OF PEKING-DUCK

C. S. CHOW

(Abstracts)

I. Distribution and variation in amounts of methionine, cyctine and total sulfur in the fertilized egg of Peking duck during incubation.

The amounts of methionine, cyctine and total sulfur in brain and liver of the Peking duck embryo are found to increase gradually during the development of the embryo. The amount of cyctine in brain is more than that in liver, but the amount of methionine in brain is less than that in liver. The sulfur-containing amino-acids in white and yolk of the fertilized egg are found to decrease in amounts during incubation, apparently they are the immediate origins of those found in brain and liver of embryos.

In addition, the amounts of sulfur-containing amino-acids in shell membranes are also found to decrease during incubation of the fertilized egg. Thus it is evident that shell membranes are also involved in the sulfur metabolism of developing duck embryos. It is also noted that the cyctine content in the shell membranes of the egg of Peking duck is mounted to 5.46 % on wet basis of membranes.