

收集;分别测定各管的酶活性和放射性(见图5)。 ^{125}I 放射性集中在碱性磷酸酶B峰处,说明分离出的二种碱性磷酸酶确是不同的成分。

有关从各种动物脏器中提取碱性磷酸酶的方法各异^[3-6],但均未提到猪肾中碱性磷酸酶的同功酶问题。本文中直接用正丁醇处理肾组织匀浆,比 Morton^[4]的方法简便。我们在 DEAE 纤维素层析的不同条件中见到有洗脱性质不同的二个碱性磷酸酶存在,并用同位素标记得到了证实。

参 考 文 献

- [1] King, E. J. et al.: *Micro-analysis in Medical Biochemistry*, 3rd. ed., Churchill. London, 85, 1956.
- [2] Lowry, O. H et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [3] Morton, R. K.: *Biochem. J.*, 57, 595, 1954.
- [4] Mathies, J. C.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1121, 1958.
- [5] Binskey, F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 228, 559, 1957.
- [6] Binskey, F.: *J. Biol. Chem.*, 236, 735, 1961.

[本文于1980年6月5日收到]

猪心线粒体可溶性腺三磷酸酶($\text{F}_1\text{-ATPase}$)冷敏感性的研究

赵 云 鵬 张 淑 秀

(中国科学院生物物理研究所)

从猪心线粒体中分离出来的可溶性、高纯度腺三磷酸酶($\text{F}_1\text{-ATPase}$ 以下简称 F_1),既是线粒体内膜中 $\text{H}^+\text{-ATP}$ 酶的活性部位,又是线粒体能量转换过程中重要的偶联因子。

可溶性腺三磷酸酶通过柄部(OSCP)与嵌入膜内的基部(F_0)相联接形成腺三磷酸酶复合物。在复合物中呈结合状的 F_1 具有对能量转移抑制剂(寡霉素、芸香霉素)敏感及冷稳定的特性。但是,一旦 F_1 从复合物中分离下来,就变得对寡霉素不敏感及冷不稳定了。如将 F_1 于 $0-2^\circ\text{C}$ 放置较短时间,酶的水解活性及偶联活性就明显下降^[1]。从酵母、大肠杆菌、鼠肝等不同来源获得 F_1 都具有同样特性^[2]。

A. Bruni 等^[3]认为膜上 F_1 的冷失活与腺三磷酸酶抑制剂有关。Penefsky^[1]等认为可溶性腺三磷酸酶冷失活是由于酶遇冷分解所致。但是,如何分解,以及酶的冷失活与酶分解的关系等问题还有待研究。

本文介绍一种分离可溶性腺三磷酸酶 F_1 的较简便方法,并就此酶冷失活的机理及几种醇类对 F_1 冷失活的保护作用进行初步的探讨。

材 料 及 方 法

一、材料: 新鲜猪心,取自北京市食品公司。

二、方法:

1. 线粒体制备: 除了肉糜洗涤液改为 0.125M 氯化钾、 0.001M EDTA ($\text{pH}7.5$) 以外,其余步骤基本按 Green^[4]方法操作。所得线粒体悬浮于 0.10M 蔗糖、 10mM Tris-SO_4 , 0.001M EDTA $\text{pH}7.4$ 的介质中,冷冻保存。

2. F_1 的制备 按改进的方法^[5],用 Triton X-100 提取低渗的线粒体,然后经超声(频率 $21\pm 1\text{Kc}$,功率 600瓦),硫酸铵分部沉淀及 65°C 热处理后制得 F_1 溶液,保存在 0.55 饱和度硫酸铵, 1mM ATP $\text{pH}7.2$ 溶液中。

3. F_1 的冷敏感性测定 取 F_1 的 0.55 饱和度和硫酸铵溶于 $14,000\text{rpm}$, 0°C , 离心 20 分钟,得 F_1 沉淀,将它溶于 50mM Tris-SO_4 $\text{pH}7.4$ 缓冲液中,放置于 $0-2^\circ\text{C}$ 冷处理 $2-3$ 小时。测定处理前后 F_1 活性等的变化。

4. 醇类的保护实验: 将 10% 甲醇、乙

醇、正丙醇、异丙醇、丙三醇和 5 % 正丁醇-50 mM Tris-SO₄ pH7.4 溶液中加入 F₁ 后,测定冷处理前后的酶活性及其他性质。

5. 酶活性的测定^[6] 按 ATP 在酶作用下水解所释放的无机磷量来计算。用 ATP 再生系统来测定。此系统含有 2mM 硫酸镁, 0.5 mM EDTA, 50mM 氯化钾, 20mM Tris-SO₄ pH8.0, 2mM 磷酸烯醇丙酮酸, 6mM ATP, 32 微克丙酮酸激酶, 10—30 微克酶蛋白。反应体积 0.5 毫升, 以加入 ATP 及磷酸烯醇丙酮酸开始反应, 0.5 毫升 5 % 三氯醋酸使反应终止。取滤液用钼酸铵法在 660 毫微米波长 (国产 721 型分光光度计) 比色测定无机磷的含量。蛋白含量用 Folin-酚法测定, 用白蛋白作标准。

6. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 经各种处理后的 F₁ 样品加入少量甘油及溴酚蓝后, 即可按 Davis^[7] 方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。凝胶浓度为 7 %, 样品蛋白量 400 微克/管。电泳液为 Tris-甘氨酸缓冲液 pH8.3, 电流 2.5 毫安/管, 泳行 3—4 小时, 上槽阴极, 下槽阳极, 凝胶经考马士兰染色 1 小时后, 用甲醇-醋酸-水脱色, 然后样品于 CS-900 型双波长光谱扫描仪上进行扫描分析, 扫描波长 590 毫微米, 参比波长 700 毫微米, 狭缝长 30 毫微米, 宽 5 毫微米, 纸速 40 毫米/分。

7. 沉降常数的测定 室温放置的 F₁ (4.5 毫克/毫升) 及冷处理的 F₁ (8 毫克/毫升) 均溶于 0.1M Tris-SO₄ pH7.4 缓冲液中, 于日立 UAC-1A 型超速分析离心机测定沉降常数, 60,000 rpm, 离心 45 分钟。

8. 紫外差光谱分析 F₁ 样品于日立 340 型记录式双光束分光光度计上扫描, 波长范围 200—350 毫微米, 吸收池光径 10 毫米, 扫描速度 30 毫米/分, 狭缝 1.5 毫微米。

结果和讨论

一、F₁ 的冷失活性质

用上述方法制备的 F₁ 酶比活性在 3—6 微克分子磷/分/毫克蛋白, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图上呈单一峰 (图 1a); 用超速离心法测

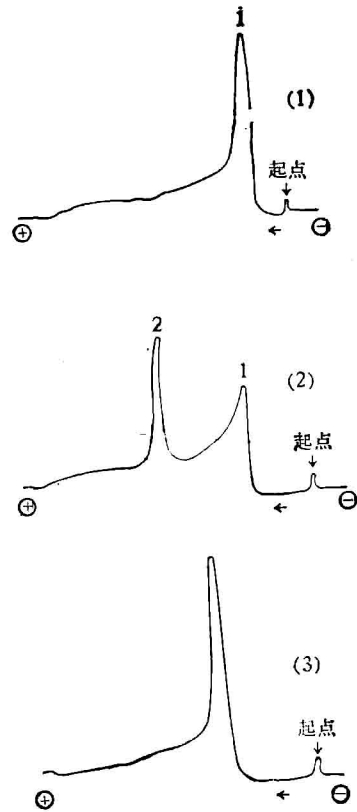


图 1 F₁ 聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图

(1) 室温下 F₁ (2) 冷处理后 F₁
(3) 加入 20% 甲醇冷处理后 F₁。

得沉降系数为 10.8S 的单一峰 (图 2a)。这表明制得的 F₁ 纯度较高。

当此酶在 0℃ 放置 2—3 小时后, 酶比活性迅速下降 89% (表 1)。同时冷处理的酶制剂在

表 1 有机溶剂对 F₁ 冷失活的保护作用

有机溶剂	酶 比 活		下降%
	冷冻前	冷冻后	
无	3.54	0.40	89
10% 甲醇	3.30	3.01	10
10% 乙醇	2.10	2.10	0
10% 正丙醇	0.90	0.60	32
10% 异丙醇	1.63	1.43	13
10% 丙三醇	4.17	1.27	70
5% 正丁醇	0.82	0.074	89.5

聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图上明显地出现二

个峰(图 1₍₂₎)；超速离心法也同样测出二个峰，其沉降常数分别为 9.3S 和 2.8S(图 2a)，看来，此酶经冷处理后水解活性下降可能与酶分子分解为 9.3S 和 2.8S 二个较小的片段有关。

另外，用紫外差光谱的方法比较了 F_1 分子中的生色基团—酪氨酸侧链在冷处理前后特征的变化。从实验结果看来， F_1 分子中的生色基团所处的分子微区的特征没有明显差异，因此， F_1 的冷失活性与酪氨酸侧链的特征关系并不密切。

从上述结果看出， F_1 冷处理后酶活性的明显下降似与酶遇冷分解有关。

二、防止 F_1 冷失活的研究

在线粒体内膜腺三磷酶的拆离与重组的研

究中，保持拆离后各部分在重组时具有高的酶活性是很重要的。而 F_1 的冷失活性质却给重组工作带来了一定的困难。有的报道指出，在 F_1 遇冷时，采取一些保护措施，可以防止冷失活。

F_1 在 0—2℃ 放置 2—3 小时后，酶比活性即从 3.54 微克分子磷/分/毫克蛋白降到 0.40 微克分子磷/分/毫克蛋白*，下降 89%。然而在 F_1 冷处理时，若预先加入一定量的醇类，则酶活性在不同程度上受到保护。表 1 比较了六种醇类的保护作用。从表 1 中看出，在相同浓度下(仅正丁醇浓度为 5%)以甲醇、乙醇、异丙醇的保护作用比较明显，其中尤以乙醇的保护作用为最好。但是，值得注意的是它们在对 F_1 酶活性的冷失活有保护作用的同时，使正常的酶活性出现了不同程度的下降；下降的程度正丁醇为 76%，正丙醇为 74%，乙醇为 36%。相比之下，以甲醇作为防止冷失活的保护剂比较理想。

从表 1 中还可看出六种醇类对 F_1 冷失活的保护作用与各自的链长有关。

Günter Vogel^[3] 等人认为醇类的羟基能在酶外形成一个疏水区。醇类对 F_1 冷失活的保护作用可能与此有关。但是从表 1 看出有三个羟基的丙三醇的保护作用比有一个羟基的正丙醇和异丙醇都差。因此，保护作用不能仅用醇类在酶分子外部形成一个疏水的外环境来解释。有人认为酶遇冷分解也可能是由于酶分子内部的疏水键结合力受到破坏而引起的。而醇类的保护作用可能恰好在于它能使疏水键结合力不受冷处理破坏。上述二种因素对保护 F_1 遇冷分解很可能都有一定的作用。

三、甲醇对 F_1 的保护机理

F_1 在冷处理时若有 20% 甲醇存在，则所得结果与未经冷处理的结果相似；不仅酶活性不下降，而且在聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图及超速离心沉降图上都只出现一个峰(见图 1(3)及

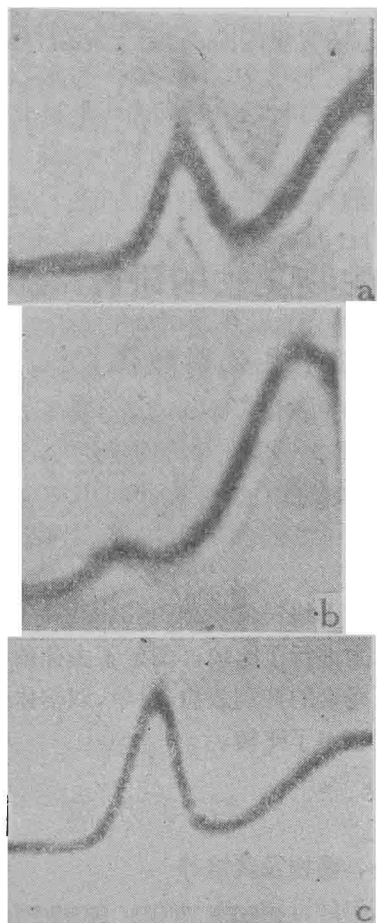


图 2 超速离心分析图谱

- a. 室温下的 F_1 峰值 10.8S
- b. 冷处理后的 F_1 , 大峰值 2.8S, 小峰值 9.3S
- c. 加入 20% 甲醇冷处理后的 F_1 峰值 7.8S。

* 此值系沿用本实验系统方法测定，按 Biochimie, 57, 959, 1975 所述方法测定；酶比活为 40—50 微克分子磷/毫克蛋白/分与有关文献报道基本一致。

图 2c), 只是超速离心法测得此峰的沉降常数由 10.8S 降为 7.8S, 所分解部分的分子量远小于 2.8S 的片段, 以致于在本实验条件下不呈峰形而只在界面扩散 (见图 1c) 及图 2c)。由此可见, 即使有甲醇存在, F_1 遇冷还会发生部分分解 ($10.8S \rightarrow 7.8S$), 但是这种分解并未危及它的活性中心, 因此酶的水解活性无变化, 而无甲醇保护时, F_1 遇冷大部分分解成 2.8S 片段, 从而破坏了酶活性中心, 使酶活性下降。这提示酶分子的降解与 F_1 酶活性的丧失有密切关系。

H. S. Penefsky^[1] 等认为 F_1 的冷失活机制与分解有关, 即天然的 11.9S 的 F_1 分子先分解成 9.1S 的片段, 再分解成 3.5S 的片段, 而 3.5S 的片段又可凝聚成 9.1S 的片段。但此分解与酶水解活性的关系并未得出明确的结论。

我们的结果表明, F_1 经冷处理后, 降解成二个较小的片段 (2.8S 及 9.3S)。同时, 酶水解活性下降 89%。当有 20% 甲醇存在时, 虽有

一定的降解 (从 10.8S 变成 7.8S), 但酶活性却无明显变化。至于 7.8S 片段的分子结构及立体构型是否发生变化等问题, 还有待深入研究。

杨福愉、林治焕同志对本工作提出宝贵意见, 史宝生、杨玉茹、王敖金等同志参加部分技术工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Penefsky, H. S. and Warner, R. C.: *J. of Biological Chemistry*, **240**(12), 4692—4702, 1965.
- [2] Günter Vogel and Rosuith Sternhart: *Biochemistry*, **15**(1), 208—216, 1976.
- [3] Bruni, A. Frigeri, L. and Bignn, E.: *Biochemistry et Biophysica Acta*, **462**, 323—332, 1977.
- [4] Green, D. E. and Zeigher, D. M.: *Methods in Enzymology*. Vol. VI., p. 418, 1963.
- [5] 林治焕等: 待发表
- [6] Racker, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1660, 1962.
- [7] Danis, B. J.: *Annals, N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 406, 1964.

[本文于 1980 年 5 月 28 日收到]

单倍体、双倍体酵母线粒体生物发生的研究

II. 酵母线粒体去葡萄糖阻遏过程中氧化磷酸化及 NADH 脱氢酶活力的变化*

陈受宜 黄有国 邢菁如 杨福愉

(中国科学院生物物理研究所)

酵母是兼性细胞。培养基中葡萄糖浓度较高时与无氧条件相似, 酵母细胞以无氧呼吸为主; 当转移到葡萄糖浓度较低的介质中生长时, 线粒体数量与质量均有显著变化, 结构和功能也由不完整到完整^[2]。此变化在一定程度上反映了线粒体的生物发生过程。也是细胞内核质和线粒体两个系统间相互协同的结果。氯霉素是阻遏线粒体蛋白质合成的专一抑制剂, 可用它来研究线粒体在生物发生过程中的自主程度。

本工作用酵母为材料, 对葡萄糖阻遏与去

阻遏状态下线粒体氧化磷酸化及 NADH 脱氢酶的活力进行了比较, 测定了去葡萄糖阻遏过程中氯霉素的抑制效应, 对单、双倍体酵母的相应变化也作了比较。

材 料 与 方 法

一、菌株及其培养

面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 2982 (双

*本工作完成于 1974 年。