

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。

倍体)和2980(单倍体)*。培养条件与前文^[1]相同。

二、线粒体的制备

分离基本按 Utter 法^[3]

1. 形成原生质体 A. 预处理菌体: 在室温下离心 2,000 rpm, 15 分钟, 收集酵母细胞, 并用蒸馏水洗三次。按每克湿酵母加 4 毫升巯基乙酸钠, 0.1M Tris-HCl 缓冲液 pH9.0, 30℃保温 30 分钟, 3,000rpm 离心 10 分钟。沉淀用 0.7M 山梨醇, 0.3M 甘露醇, 0.01M 柠檬酸磷酸缓冲液 pH5.8, 0.1mM EDTA 溶液洗二次。

B. 用蜗牛酶处理菌体: 每克湿酵母加 4 毫升 1.0M 山梨醇, 0.02M 柠檬酸-磷酸缓冲液 pH5.8, 内含 30 毫克蜗牛酶蛋白。(本实验室从我国海南岛产褐云玛瑙螺中提取^[4]), 30℃保温 50—60 分钟, 约可形成 90% 以上的原生质体; 0—4℃ 下离心 4,000rpm, 10 分钟; 沉淀用冷的 1.0M 山梨醇, 0.02M 柠檬酸-磷酸缓冲液 pH5.8 洗 3—4 次。

2. 分离线粒体 将酵母原生质体悬于 5 倍体积的分离介质 (0.25M 蔗糖, 0.05M 磷酸钾缓冲液 pH6.8, 0.15% 牛血清蛋白, 1.0mM EDTA) 中, 在冷却下用组织捣碎机以低速捣碎 15 秒, 再以差速离心法分离线粒体。先将悬液在 0—5℃ 下离心 3,000rpm, 10 分钟, 除去未破碎的细胞, 原生质体以及细胞核等。上清液在 0—4℃ 下 10,000×g 离心 10 分钟, 得棕红色沉淀 (线粒体)。再用上述分离介质洗二次。

三、线粒体蛋白质含量的测定

用 Folin 酚法^[5]。每克湿酵母可得 3—4 毫克线粒体蛋白。

四、线粒体 P/O 比值的测定^[6]

用 Warburg 测压计测定。反应液的组分为: 480mM 山梨醇, 20mM 磷酸钾缓冲液, pH 6.5, 10mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液 pH6.5, 7.5 mM MgCl₂, 1.1mM EDTA, 0.5mM ATP, 0.15% 牛血清蛋白, 5 毫克蛋白的线粒体和 12mM 琥珀酸或 α -酮戊二酸。支管中加入过量的己糖激酶和 25mM 葡萄糖, 总体积 2 毫升。反应

瓶先在 30℃ 恒温水槽中平衡 5 分钟, 然后关闭测压管的活塞, 读数, 并将支管中的溶液加入反应瓶内, 继续保温 15 分钟; 每隔 5 分钟记录一次; 平衡 5 分钟期间的氧吸收是用外推法求得的。反应终了加入 0.2 毫升 50% 三氯乙酸, 然后用水稀释, 过滤; 滤液按 Sumner^[7]法测定无机磷, 根据无机磷的减少量计算合成 ATP 的量。

五、呼吸控制率的测定^[8]

用振动铂电极法测量氧吸收, 并用电子电位差自动记录仪连续记录。氧化底物为琥珀酸, 乙醇或还原辅酶 I (NADH)。反应液内含 320 mM 山梨醇, 10mM 磷酸钾缓冲液 pH7.0, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH7.0, 0.1mM EDTA, 10mM KCl, 6mM MgCl₂, 0.15% 牛血清蛋白; 反应总体积为 1.3 毫升。加入 0.5mM ADP; 测定了加入前、后呼吸速度之比。

测定时先将加有反应液加的反应杯放入 28℃ 恒温水浴, 并将电极浸入反应液中, 振动电极。加入约 0.8 毫克蛋白的线粒体, 再加入底物 (12 mM 琥珀酸, 或 10mM 乙醇, 或 1mM NADH), 待记录一段呼吸后再加入 0.5mM ADP, 记录其刺激呼吸的情况。

六、NADH 脱氢酶活力测定

1. 方法 反应混合液含 0.65M 甘露醇, 20mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液 pH6.5, 5mM 磷酸钾缓冲液, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1 mM KCN。K₃Fe(CN)₆ 为 35mM。抗霉素 A 为 175 微克/毫升。NADH 最终浓度为 1.6 mM。对照管中不加抗霉素 A、铁氰化钾和底物; 实验管 1 加铁氰化钾; 实验管 2 加铁氰化钾和抗霉素 A。用重蒸馏水将各管体积补足至 3.5 毫升。用意大利 CF4R 双光束分光光度计在波长 420nm 处进行测定。随后在实验管 1、2 中迅速加入底物, 计时, 记录反应 15 秒时光密度数。根据 K₃Fe(CN)₆ 的 $\epsilon_{420} = 1.03\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算酶的活力。

2. 底物浓度曲线 如图 1。反应系统中加入 0.735 毫克线粒体蛋白。由图 1 可见, 最

*由中国科学院微生物研究所方沁芳和徐浩同志推荐, 该所菌种室提供, 特此致谢。

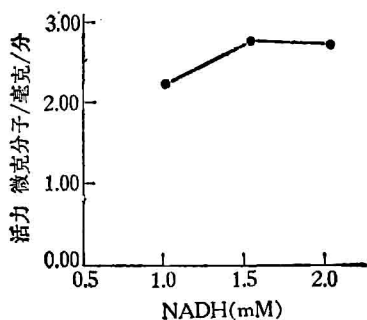


图1 底物浓度曲线

适底物浓度约为 1.5mM。

3. 酶浓度曲线 如图2。反应系统中底

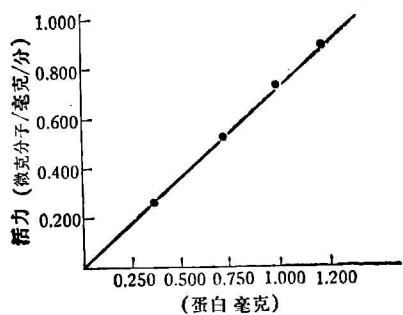


图2 酶浓度曲线

物 NADH 的浓度为 1.6mM。由图可见，反应系统中加入的线粒体蛋白高达 1 毫克时，酶活

与加入蛋白量成比例。

实验结果与讨论

一、单、双倍体面包酵母不同条件下线粒体功能的比较

为了研究线粒体的生物发生，我们比较了去葡萄糖阻遏后(以0.8%葡萄糖为碳源培养至9—10.5小时)^[1]以及在氯霉素抑制条件下线粒体的氧消耗和氧化磷酸化。从表1、2可以看出，酵母细胞在葡萄糖阻遏状态下，线粒体基本上没有呼吸；当去葡萄糖阻遏时，耗氧量明显增加，并出现了ADP刺激呼吸和磷酸化功能。在这一过程中，如果有氯霉素存在，耗氧量的增加则受到一定程度的影响，磷酸化也有不同程度的降低。用 Warburg 测压计和振动铂电极测出的结果相符。这一结果与前文^[1]所报道的在去葡萄糖阻遏过程中存在氯霉素时，还原辅酶I-细胞色素C还原酶和细胞色素C-氧化酶的活力受到明显抑制一致。

对单倍体酵母进行的类似实验表明：变化趋势与双倍体酵母相似(表3)，未见明显差异。双倍体酵母染色体DNA为单倍体的两倍。又据最近报道，其线粒体DNA分子数也约为单

表1 双倍体面包酵母2982在不同条件下线粒体耗氧量、氧化磷酸化的比较(用瓦氏测压计测定)

氧化底物 实验条件	项目	琥 珀 酸		α- 酮 戊 二 酸	
		耗 氧 量 (μAO/毫克/分)	P/O	耗 氧 量 (μAO/毫克/分)	P/O
葡萄糖阻遏		0	无	0	无
去葡萄糖阻遏		7.1	1.2	7.4	1.2
氯霉素抑制		4.6	0.7	7.1	0.5

μAO/毫克/分：微克原子氧/毫克蛋白/分

表2 双倍体面包酵母2982在不同条件下线粒体功能的比较(用振动铂电极法测定)

氧化底物 实验条件	项目	琥 珀 酸		NADH		EtOH	
		耗氧量(μAO/ 毫克/分)	加入ADP前后 呼吸速度之比	耗氧量(μAO/ 毫克/分)	加入ADP前后 呼吸速度之比	耗氧量(μAO/ 毫克/分)	加入ADP前后 呼吸速度之比
葡萄糖阻遏		0	无	0	无	0	无
去葡萄糖阻遏		0.075	1.67	0.142	1.30	0.090	1.33
氯霉素抑制		0.058	1.42	0.095	1.00	0.066	1.05

倍体内的两倍^[10]。这样,线粒体 DNA 数与核 DNA 数保持恒定的比例。因此,单、双倍体酵母的线粒体在自主性方面显然不会有明显的差异。

表 3 单倍体酵母细胞(2980)在不同条件下线粒体功能的比较 (用振动铂电极法测定)

项 目 实验条件	耗氧量 (μAO /毫克/分)	加入 ADP 前后 呼吸速度之比
葡萄糖阻遏	0.04	1.0
去葡萄糖阻遏	1.03	1.42
去葡萄糖阻遏+氯霉素	0.09	1.10

二、酵母线粒体不同条件下 NADH-铁氰化钾脱氢酶活力的比较

酵母线粒体与动物线粒体不同,它能直接氧化还原辅酶 I。这是因为,酵母线粒体的内膜外侧有 NADH 脱氢酶,这一酶反应可以利用高铁氰化钾作为人工电子受体。通过 NADH-高铁氰化钾脱氢酶活力是否受抗霉素

A 抑制反映出内膜的完整性程度。因为,在完整酵母线粒体中,一部分外源 NADH 通过内膜外侧 NADH 脱氢酶和膜上的呼吸链将电子传递给铁氰化钾,这一过程受抗霉素 A 的抑制;而在内膜不完整的情况下,则外源 NADH 可透过内膜,并与其内侧 NADH 脱氢酶作用,直接将电子传递给铁氰化钾而不受抗霉素 A 抑制

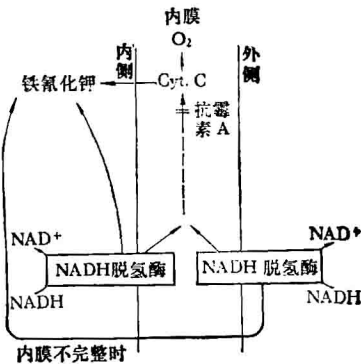


图 3 酵母线粒体内膜 NADH-脱氢酶的定位及其与铁氰化钾的作用^[9]

表 4 酵母线粒体在不同条件下 NADH-铁氰化钾脱氢酶活力的比较(微克分子/毫克/分)

实验条件 活力	葡萄糖阻遏		去葡萄糖阻遏		去葡萄糖阻遏+抗霉素	
		+抗霉素		+抗霉素		+抗霉素
菌株						
双倍体 (2982)	1.21	1.13	2.77	2.04	2.54	2.37
单倍体 (2980)	2.72	2.49	3.21	2.66	3.23	2.93

(图3)。表4显示,在葡萄糖阻遏状态下,无论是单倍体还是双倍体酵母线粒体内膜 NADH-铁氰化钾脱氢酶受抗霉素 A 抑制部分只占 8% 和 7%,当进入去葡萄糖阻遏状态时,受抗霉素 A 抑制的部分则分别上升为 17% 和 26%。这可能反映在去葡萄糖阻遏过程中,内膜结构的完整性增加了。在同样条件下,如有氯霉素存在,酶的总活力未见有显著变化,但受抗霉素 A 抑制的部分则下降至 9% 和 7%。这反映在线粒体核糖体蛋白质合成受抑制情况下,线粒体内膜仍然处于不完整状态。以上为初步结果;要肯定线粒体蛋白质合成体系对内膜结构完整性有无影响,还需要作进一步研究。

参 考 文 献

[1] 林治煊等:《生物化学与生物物理进展》,1981年第1期。
[2] Utter, M. F.: *Aspect of Yeast Metabolism*, (ed. Mills, A. K.), 1967.
[3] Utter, M. F. et al.: *J. Bacteriology*, 88(6), 1762, 1964.
[4] 生物物理所三室:《生物化学与生物物理进展》,1978年,6期,4页。
[5] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》,1973版,28页。
[6] Ohnishi, T.: *J. Biochem.*, 56, 5, 1964.
[7] Sumner, J. B.: *Science*, 109, 413, 1944.
[8] Ohnishi, T.: *Bull. Soc. Chimbiol.*, 48, 1189, 1966.
[9] In-Cheol Kim and Diana S. Beattie: *Europ. J. Biochem.*, 36, 518, 1973.
[10] Whittaker, P. A. and Dunks, S. M.: *Mitochondria: Sturcture, Function and Assembly*, p. 118, 1978.
[本文于 1979 年 12 月 5 日收到]