

猪心线粒体内膜 H^+ -ATP 酶复合体的分离——两种分离方法的比较

尤美莲 程秋琛*

(中国科学院生物物理研究所)

H^+ -ATP 酶复合体广泛分布于真核细胞的线粒体膜、叶绿体膜及原核细胞的质膜上。它是参与氧化磷酸化反应的一个重要酶复合体,由一可溶性的头部(F_1)与一不可溶性的嵌在膜中的疏水蛋白部分(F_0)以及联系这两者的柄(OSCP)所组成。近年来,国外很多实验室用不同去垢剂,从牛心线粒体、细菌中提取 H^+ -ATP 酶复合体。Berden^[1]曾报道用 TritonX100-胆酸提取的 H^+ -ATP 酶复合体具有对寡霉素敏感特性。Hatefi^[2]则提到用脱氧胆酸-胆酸可以得到一个既有水解活力,又有 $^{32}P_i \rightleftharpoons ATP$ 交换活力的 H^+ -ATP 酶复合体。本文对猪心线粒体内膜的 H^+ -ATP 酶复合体的提纯进行了研究,并对这两种分离方法进行了比较。还对提纯的酶复合体重建于人工膜后的活性(酶水解活力,对寡霉素敏感性, $^{32}P_i \rightleftharpoons ATP$ 交换)进行了检测。

一、实验材料和方法

1. 猪心线粒体的制备 除用 SPE 液(250 mM 蔗糖, 10 mM 磷酸缓冲液 pH7.4, 1 mM EDTA)代替洗涤液和捣碎液外,其它详见文献[3]。

2. 亚线粒体的制备 参照文献[3]。

3. 蛋白浓度测定 按 Lowry 的方法^[4]。

4. H^+ -ATP 酶的水解活力及其对抑制剂(寡霉素)的敏感性 活力测定基本按照 Ramon Serran^[5] 等的方法。活力单位为微克分子无机磷/毫克/分。

5. $^{32}P_i \rightleftharpoons ATP$ 交换测定 参考 T. E. Conover 方法^[6],并做了修改。在含有 250 mM 蔗糖, 2 mM EDTA 20 mM $MgCl_2$, 2.5 毫克牛血清蛋白, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 20 mM 含 $^{32}P_i$ 的磷

酸缓冲液的反应液中,加入 H^+ -ATP 酶及适量大豆磷脂,在 30℃ 保温 10 分钟。最后加入 10 mM ATP 起始反应。反应 5 分钟,总体积为 1 毫升。0.1 毫升 35% $HClO_4$ 终止反应。样品在台式离心机上离心(3000 转/分)10 分钟,取出 0.4 毫升上清液做放射性测定用。

6. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Berden 方法^[1]。

7. H^+ -ATP 酶复合体保温嵌入脂质体的方法 将初步纯化的大豆磷脂^[3]在真空下干燥,除去原有溶剂(氯仿、甲醇)后,悬浮在超声液中(66 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 0.2 mM EDTA),通 N_2 ,密封后超声(150 瓦, 20 千周),使磷脂溶液变为透明。所得脂质体与提纯的 H^+ -ATP 酶复合体按一定比例混合,于 30℃ 保温 10 分钟。

二、结果和讨论

1. 用 TritonX 100-胆酸法提纯 H^+ -ATP 酶复合体 Berden 报道^[1]用 TritonX-100-胆酸为去垢剂,分离提纯 H^+ -ATP 酶复合体的方法,其分离流程如表 1 所示。

(1) TritonX100 与亚线粒体蛋白不同比率,对 H^+ -ATP 酶复合体产率的影响 用去垢剂分离膜蛋白,不仅要考虑去垢剂本身的性质(溶解能力,温和性),而且要考虑去垢剂与亚线粒体蛋白的比率。同一种去垢剂,如与蛋白比率不同,不仅直接影响 H^+ -ATP 酶复合体的产率,对于保持酶分子的天然构象也是重要的。

* 本工作是在杨福愉同志指导下进行的,特此致谢。

表 1 TritonX100-胆酸盐法分离 H⁺-ATP 酶复合体流程

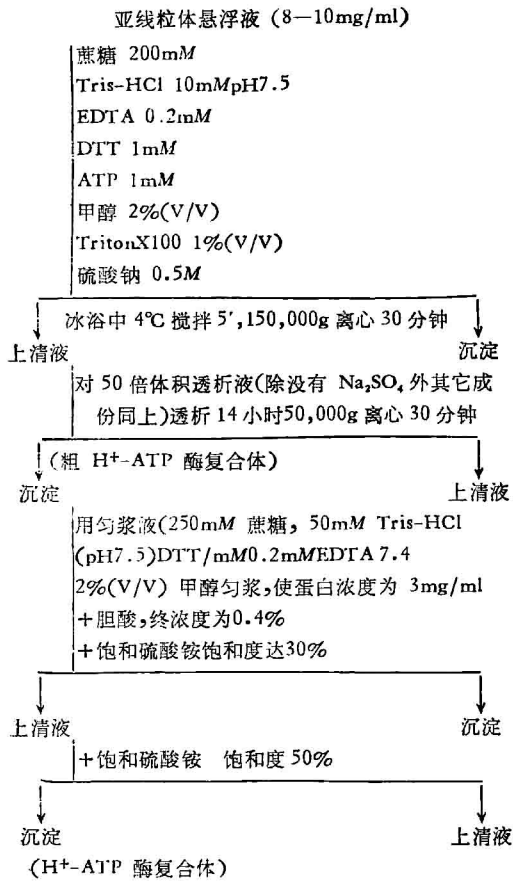


表 2 不同 $\frac{\text{TritonX100}}{\text{蛋白}}$ 比率对 H⁺-ATP 酶复合体产率的影响

TritonX100: 蛋白	1: <0.6	1: 0.6	1: 0.8	1: 1	1: 1.2	1: >1.2
亚线粒体蛋白 (mg)	113	113	113	113	113	113
粗 H ⁺ -ATP 酶复合体 (mg)	26.0	32.0	33.2	35.4	30.4	9.9
纯化的 H ⁺ -ATP 酶复合体 (mg)	1.5	10.2	18.7	19.1	15.9	<2.5
产率 (%)	1.35	9.1	16.6	16.9	14.0	<2.5

因此,我们在提纯过程中,对不同 TritonX100: 亚线粒体蛋白比例进行了试验。结果表明: TritonX 100: 亚线粒体蛋白 = 1:0.8—1 时, H⁺-ATP 酶复合体产率最高,加大豆磷脂保温重组后,水解活力稳定。不在这一范围,产率下降(表 2),活力极微。

(2) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析^[1]

图 1 显示了用 Berden 方法分离出的猪心线粒体 H⁺-ATP 酶复合体解聚后所含的亚基。带 2, 3, 6, 10, 14, 分别是酶复合体 F₁ 部分的五个亚基 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ 。带 9 为 OSCP。带 7, 8, 11, 12 为 F₀ 部分。分析结果与文献报道^[1]相似。

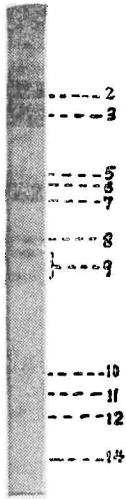


图 1 猪心线粒体 H⁺-ATP 酶复合体凝胶电泳图谱

样品量 40μg 在 1%(W/V)SDS 中解聚, 分离胶用考马氏亮蓝染色。

(3) 大豆磷脂对 H⁺-ATP 酶复合体活力的影响

H⁺-ATP 酶复合体是嵌于线粒体内膜上的一个酶,其活性对膜磷脂表现出强烈的依赖性。寡霉素是 H⁺-ATP 酶复合体的抑制剂。H⁺-ATP 酶复合体从内膜上分离下来以后,由于去垢剂的脱脂作用,水解活力很低,甚至丧失。同时对寡霉素的敏感性随着含脂量的减少而降低。但将分离的 H⁺-ATP 酶复合体与大豆磷脂保温重组后,其水解活力明显恢复。活力提高最大可达 50 倍(表 3)。同时对寡霉素的敏感性也随着磷脂的加入而逐步增加(图 2)。

Berden 提出的从牛心线粒体中提取 H⁺-ATP 酶复合体, TritonX100 与亚线粒体蛋白的比率范围在 1:0.6—1。我们在实验中发现 Triton 与蛋白维持在合适的比率,是影响产率、活力的主要因素。对猪心线粒体来讲, Triton X100:亚线粒体蛋白 = 1:0.8—1 较为合适。超

表 3 提纯的 H⁺-ATP 酶复合体加大豆磷脂后水解活力的恢复

	实 验 条 件				
	提纯的 H ⁺ -ATP 酶复合体	提纯的 H ⁺ -ATP 酶复合体: 大豆磷脂			
		1:4	1:8	1:12	1:20
活 力 (微克分子无机 磷/毫克/分) 活力增加倍数	0.058	2.33	2.39	2.96	2.48
		40.0	41.3	51.0	42.8

以上数据是三次实验的平均值。
H⁺-ATP 酶复合体 25 微克,水解活力测定按上述方法进行。
H⁺-ATP 酶复合体加大豆磷脂后,在 30℃ 预保温 10 分钟,然后用相同方法测定。

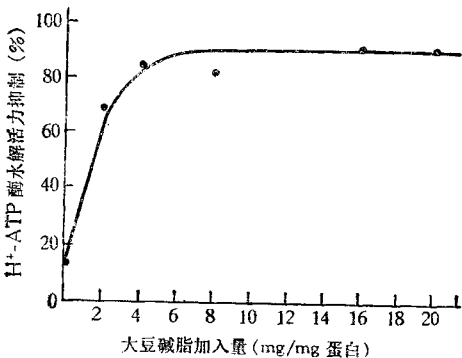


图 2 大豆磷脂对 H⁺-ATP 酶复合体寡霉素敏感性的影响

反应体系中含有 0.8 微克寡霉素,测定条件同酶水解活力的测定

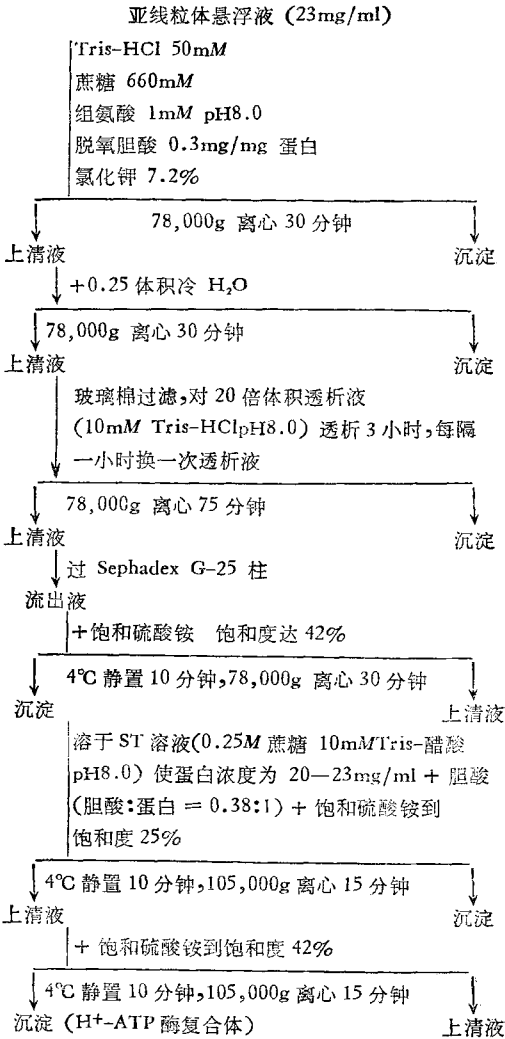
过或低于这个范围,产率和活力都明显降低或丧失。在此比率范围所得纯化 H⁺-ATP 酶复合体加入大豆磷脂保温重组后,水解活力恢复最大可达 50 倍之多,高于 Berden 的结果(恢复 30 倍)。H⁺-ATP 酶复合体对寡霉素的敏感性随着大豆磷脂的增加而逐步提高,也表明了 H⁺-ATP 酶复合体对寡霉素的敏感性与磷脂及酶复合体在脂质体上的组装有密切的关系。

2. 用脱氧胆酸-胆酸法提取 H⁺-ATP 酶复合体

Hatefi 报道^[2]的提取 H⁺-ATP 酶复合体的方法是用脱氧胆酸和胆酸为去垢剂。其分离流程如表 4 所示。

Hatefi 报道^[2]用此方法可以从牛心线粒体中提取一个具有 ³²Pi $\rightleftharpoons$ ATP 交换活力并对寡霉素敏感的 H⁺-ATP 酶复合体。但我们经过

表 4 脱氧胆酸-胆酸法分离 H⁺-ATP 酶复合体流程



多次实验,从猪心线粒体提纯的酶复合体不仅水解活力在加入大豆磷脂保温重组后没有恢复(表 5)而且活力较低(与表 3 结果相比较),同时也没有 ³²Pi $\rightleftharpoons$ ATP 交换活力。

表 5 H⁺-ATP 酶复合体水解活力

	提纯的 H ⁺ -ATP 酶复合体	提纯的 H ⁺ -ATP 酶复合体: 大豆磷脂		
		1:4	1:15	1:40
活 动 (微克分子无机 磷/毫克/分)	0.45	0.45	0.45	0.45

综上所述,比较两种提纯方法, Triton X100-胆酸法,操作简便,所得的对寡霉素敏感的 H⁺-ATP 酶复合体产率高,加大豆磷脂活力

恢复高达 50 倍,重复性好,但仍然不表现 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力。脱氧胆酸-胆酸法操作繁琐,提取的酶复合体不仅水解活力在加入磷脂后无明显增加,更无 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力。从三种去垢剂 (TritonX100, 脱氧胆酸,胆酸)对亚线粒体 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力影响的比较实验(未发表资料)来看,脱氧胆酸对活力的影响较大。所以用 Hatefi 的方法从猪心线粒体中提取 H^+ -ATP 酶复合体是很困难的。

本工作得到生物物理所三室线粒体膜研究小组同志们的帮助,酶蛋白分离过程中的超速离心方面得到梁洪光同志的帮助。郭学弟同志也参加了猪心线粒体的制备等方面的工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Berden, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **501**, 424, 1978.
- [2] Hatefi, et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 956, 1978.
- [3] 杨福愉等,《生物化学与生物物理学报》,1980 年,12 卷,193 页。
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [5] Serrano, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2454, 1976.
- [6] Conver, T. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2831, 1963.

[本文于1982年6月9日收到]

由氯化胆碱和 CMP 发酵合成 CDP-胆碱

王世绪 高才昌 刘铁英 吕织云

(天津工业微生物研究所)

1955 年 Kennedy 等发现 CDP-胆碱是磷脂代谢中起重要作用的辅酶^[1]。1963 年用于临床,证明对恢复脑损伤引起的意识障碍及其它神经系统疾患有明显的疗效^[2]。

CDP-胆碱可用化学合成和酶促合成的方法制备。1970 年 Tochikura 等报道了用风干酵母由磷酸胆碱和 CMP 发酵合成 CDP 胆碱的方法^[3]。侯立向等用啤酒酵母泥代替风干酵母得到较好的收率^[4]。1972 年 Tochikura 等又报道采用胆碱激酶活力高的菌株 *Hansenula jadinii* IFO 0987 的风干菌体由氯化胆碱和 CMP 合成 CDP-胆碱^[5]。

本文报道以氯化胆碱和 CMP 为原料,用啤酒酵母泥直接合成 CDP-胆碱的反应条件。

一、材料与方法

1. 啤酒酵母泥 由天津啤酒厂提供。使用时用蒸馏水洗涤二次,3000 转/分离心 20 分钟,收集菌体。

2. 试剂 CMP 由天津啤酒厂提供,纯度为 98%。其它试剂均为市售商品。

3. CDP-胆碱相对转化率的测定 CDP-胆碱含量的测定、CDP-胆碱的分离纯化参见文献[4]。

二、实验结果

1. 发酵条件

(1) 初 pH 的影响 选择发酵液的初 pH 分别为 6.0、6.4、6.5、6.7、7.2。结果见图 1。pH6.5 左右 CDP-胆碱的转化率最高。pH 偏低或偏高转化率都明显下降。因此在以后的实验中均取 pH6.5。

(2) 氯化胆碱和 CMP 浓度的影响 从图 2 可看出氯化胆碱浓度的增加其转化率也增加。但当氯化胆碱浓度达到 80 微克分子/毫升以后,转化率无明显增加。

CMP 浓度在 10 微克分子/毫升时,CDP-胆碱的转化率最高。随着 CMP 浓度的增加而