

研究工作

H⁺-ATP 酶重建对脂质体的大小有选择性

李才元 杨福愉

(中国科学院生物物理研究所)

膜蛋白在脂质体上重建已成为研究生物膜功能的一个重要手段,但是重建过程受到许多因素的影响,其中不少还不太清楚。为了实现有效地重建,研究这些因素的作用是很有必要的。

近年来我们实验室^[1,2]及其它一些实验室^[3-5]先后通过不同的方法实现了 H⁺-ATP 酶在脂质体上的重建。所有这些方法都是加入过量的脂质体以保证重建成功。一般蛋白质与磷脂的比为 1:6—10。线粒体与亚线粒体膜中,蛋白质占 80% 左右,脂仅占 20%,即蛋白质与脂的比是 1:0.25。因此,在人工重建体系中加入磷脂的量比线粒体约高 20—40 倍。磷脂为什么要过量这么多,在重建过程中,酶是平均分散到大小不等的脂质体上,还是有选择性地与其中一部分相结合,重建生成的脂酶体的大小与脂质体相比较又发生了什么变化,研究这些问题将有助于 H⁺-ATP 酶在脂质体上进行有效的重建。

本文用保温嵌入法^[4]将猪心线粒体 H⁺-ATP 酶在相对均一的脂质体上重建,通过 Sepharose 2B 柱层析及其它方法进行分离与分析并对上述诸问题进行初步的研究。

一、材料和方法

1. 从猪心制备 H⁺-ATP 酶 按前述方法^[1]。

2. 用大豆磷脂制备相对均一的脂质体 含有 600 毫克提纯的大豆磷脂的氯仿-甲醇溶液,真空抽干后,加入 2 毫升 0.1MKCl, 0.01 M Tris (pH8.0) 的溶液,密封后使其膨胀 12 小时左右。然后再加入 2 毫升上述溶液,搅拌均匀后

进行超声处理^[6]。

超声处理用 MSE 超声波发生器针形探头进行,一般处理 5 分钟,间隔 2 分钟,振幅为 4,累计处理 2 小时,温度保持在 30℃ 左右,超声处理后的样品用离心机离心 (3000 转/分) 10—20 分钟,除去杂质。上清液经过超滤浓缩至 2 毫升左右。

取浓缩样品 1 毫升,在 Sepharose 2B 柱上进行预先分离(图 1)。收集峰 B 前半部(箭头所指区间)约 15 毫升。经超滤浓缩至 4 毫升。这样的脂质体悬浮液每毫升含磷 1.31 毫克,相当于 21 毫克磷脂。

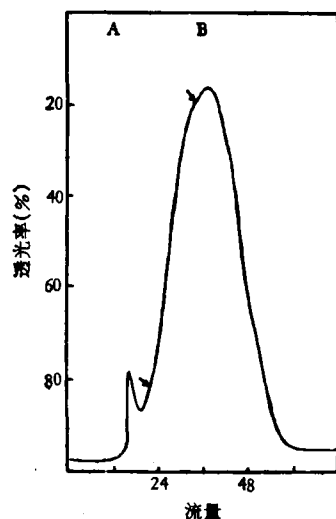


图 1 不同大小脂质体用 Sepharose 2B 柱层析图

1.0 毫升含 300 毫克大豆磷脂脂质体在 Sepharose 2B 柱上分离,箭头标志的区间系指 B 峰中收集样品的范围。

3. 脂酶体的重建 重建按 Eytan 等方法^[4]略有修改。依次加入脂质体 (6.3 毫克磷脂) 和 0.1 MKCl, 0.01M Tris (pH8.0) 缓冲溶液与 1 毫克 H⁺-ATP 酶,最终体积 0.8 毫升。加入

Mg^{2+} 时其最终浓度为 12.5mM。在 35℃ 水浴中温育 30 分钟。

4. 琼脂糖 (Sephrose 2B) 凝胶柱层析
琼脂糖 (Sephrose 2B) 系瑞典 pharmacia 出品, 装于 1.5 厘米×30 厘米柱内, 下行洗脱, 流速约为 0.5 毫升/分, 洗脱液内含有 0.1MKCl, 0.01M Tris(pH8.0), 样品体积一般为 0.8 毫升。洗脱液用 LKB 核酸蛋白检测仪连续检测, 滤光片波长 280 毫微米。

5. 含磷量测定 按 G. R. Bartlett 的方法^[7]

6. 测定蛋白质 按 Folin-酚方法^[8]。

二、结果与讨论

1. 脂质体的层析图谱 为了进一步研究 H^+ -ATP 酶在脂质体上重建产生的变化, 我们需首先了解脂质体的层析图谱。图 1 表明, 超声法制备的脂质体是不均一的。这与我们以前的报道是一致的^[6]。为了得到均一的脂质体, 可将收集的峰 B 部分超滤浓缩, 再进行柱层析检验, 就可以看到峰 A 几乎消失。样品主要是由相对均一的峰 B 组成(图 2)。

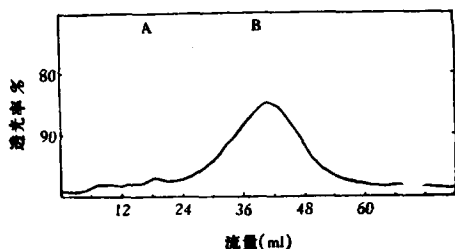


图 2 相对均一脂质体在 Sepharose 2B 柱上的层析图谱
脂质体 0.8 毫升, 含磷脂 6.3 毫克, 样品上柱前均在 37℃ 水浴中温育 30 分钟。

2. 脂酶体的层析图谱 当 H^+ -ATP 酶在脂质体上进行重建, 生成脂酶体后, 层析图谱(图 3) 与仅是脂质体或 H^+ -ATP 酶有显著差别。图 3 表明, 位于外水体积 (V_0) 的峰 A 显著增高, 它具有很强的 280nm 光吸收, 说明含有大量蛋白质, 这是生成脂酶体的结果。Folin-酚法测定表明, 加入的 H^+ -ATP 酶主要分布在峰 A 里。

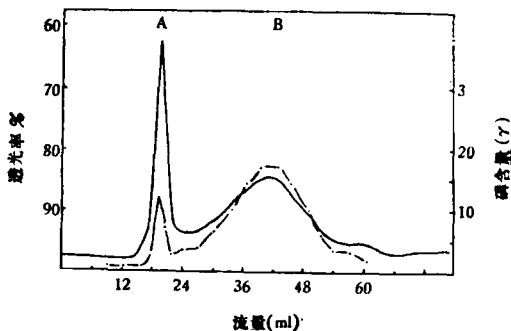


图 3 H^+ -ATP 酶重建于脂质体后(脂酶体)的层析图谱
——示 280nm 透光率; - - - 示含磷量; 脂质体含磷脂 6.3 毫克与 1.0 毫克 H^+ -ATP 酶重建, 最终体积 0.8 毫升, 在 Sepharose 2B 柱上分离, 流速为 0.6 毫升/分, 间隔 2.5 分钟收集一次。

分析峰 A 部分的含磷量是 30—40 微克。这比 H^+ -ATP 酶所含的磷 (2.6 微克/每毫克蛋白) 高 10—15 倍。约占加入脂质体 (400 微克/6.3 毫克磷脂) 的 1/10, 相当于含磷脂 0.5—0.6 毫克。可以计算, 这种脂酶体中蛋白质与磷脂的比为 1:0.5—0.6。

在同样条件下, H^+ -ATP 酶的层析图谱(图 4) 与脂酶体明显不同。前者近似一条直线, 没有洗脱峰。说明该酶被牢牢地结合在柱上, 没有洗下来。这是因为我们使用的 Sepharose 2B 柱是磷脂饱和的, H^+ -ATP 酶是一种亲脂性的蛋白质, 故单独层析时洗脱不下来。

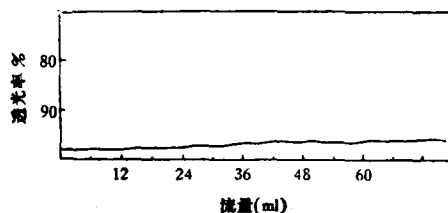


图 4 H^+ -ATP 酶在 Sepharose 2B 柱上的层析图谱
加入 H^+ -ATP 酶 3.0 毫克, 洗脱液: 0.1M KCl, 0.01M Tris (pH8.0)

我们以前的工作证明^[6], Sepharose 2B 柱层析分离脂质体最大极限约 600 Å。因此 H^+ -ATP 酶在脂质体上重建后生成的脂酶体体积显著增大(图 3)。

3. H^+ -ATP 酶蛋白与磷脂比例不同对重建的影响

图 5 是 1.0 毫克 H^+ -ATP 酶在不同数量

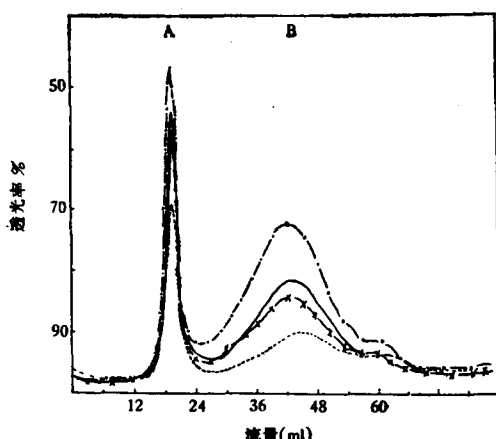


图5 蛋白质与磷脂比对 H^+ -ATP 酶重建的影响

- 含磷脂 2.1 毫克(蛋白质:磷脂=1:2)
- ×-×-×含磷脂 4.2 毫克(蛋白质:磷脂=1:4)
- 含磷脂 6.3 毫克(蛋白质:磷脂=1:6)
- · · · ·含磷脂 10.5 毫克(蛋白质:磷脂=1:10)

的脂质体 (2.1—10.5 毫克) 体系内重建后的层析图谱。我们可以看到, 当脂质体从 2.1 毫克增加到 4.2 毫克时, 峰 A 的高度显著增加。这说明生成的脂酶体量显著增大。但当脂质体继续增加到 6.3 毫克, 甚至 10.5 毫克时, 峰 A 高度增加甚小。这反映几乎所有的 H^+ -ATP 酶都已在脂质体上重建。因此脂质体进一步增加对脂酶体生成量已不再有影响。从图 5 中还可以看到, 当脂质体量很少时 (2.1 毫克), 峰 A 很低, 说明很大一部分 H^+ -ATP 酶没有结合到脂质体上, 然而这时重建体系中仍有一定数量体积较小的脂质体 (峰 B)。峰 A 与峰 B 的变化说明 H^+ -ATP 酶重建对脂质体的大小有很高的选择性, 它们只选择在体积较大的脂质体上重建, 体积较小的脂质体不能代替, 这与细胞色素氧化酶在脂质体上重建的情况不同^[12]。由此看来, 重建体系中应当提供足够数量的 H^+ -ATP 酶重建所需的体积较大的脂质体。

上述实验结果说明, 在重建过程中 H^+ -ATP 酶不是平均分散到大小不一的脂质体上, 而是有选择地在一部分大的脂体质上 (约占 1/10) 进行重建。Sephacrose 2B 柱层析 A 峰部分的脂质体直径都在 600 Å 左右, H^+ -ATP 酶的可溶性部分 (F_1) 的直径为 80—90 Å^[11], 看来

只有直径大于 440 Å 的脂质体才与 H^+ -ATP 酶进行重建, 从而产生直径为 600 Å 左右的脂酶体 (图 6)。

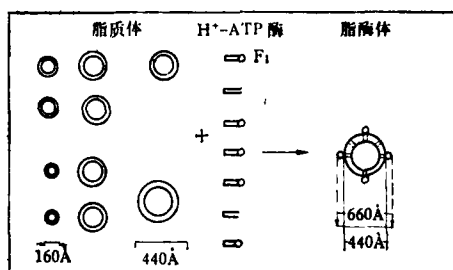


图6 H^+ -ATP 酶重建对脂质体大小有选择性的示意图

4. Mg^{2+} 对 H^+ -ATP 酶重建的影响

我们实验室曾报道^[2], H^+ -ATP 酶用胆酸盐透析法在脂质体上重建过程中, 1mM Mg^{2+} 能使生成的脂酶体 ^{32}P i-ATP 交换活力增加 6 倍以上。Eytan 等^[4] 用保温法重建时也报道有 Mg^{2+} 情况下, 重建脂酶体酶活比无 Mg^{2+} 情况下要高得多。究竟 Mg^{2+} 作用是否与脂质体的大小有关, 为此我们做了以下研究。

(1) Mg^{2+} 对脂质体大小的影响 从图 7 中可以看出, 12.5mM Mg^{2+} 会使峰 B 左移, 峰 A 增加, 这反映 12.5mM Mg^{2+} 可能诱导脂质体产生融合现象, Mg^{2+} 浓度小于 12.5mM 未发现明显作用。

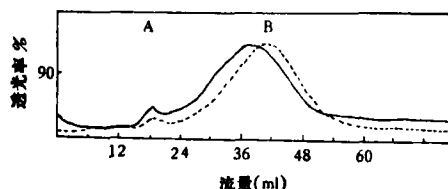


图7 12.5mM Mg^{2+} 对脂质体大小的影响

加入脂质体 0.8 毫升, 内含磷脂 6.3 毫克
——有 Mg^{2+} ——无 Mg^{2+}

(2) Mg^{2+} 对 H^+ -ATP 酶重建的影响 图 8 是有 12.5mM Mg^{2+} 与无 Mg^{2+} 时重建形成嵌有 H^+ -ATP 酶的脂酶体层析图的比较。从中可以看出, 无论有无 Mg^{2+} , 两者都呈现明显的峰 A, 这说明两种情况下 H^+ -ATP 酶都能在脂质体上重建, 并生成一定量的脂酶体, 但在 12.5mM Mg^{2+} 条件下, 峰 A 稍高, 这可能是由于

Mg^{2+} 诱导脂质体融合,使体积较大的脂质体的量稍有增加,从而形成更多的脂酶体。但是这微小的变化似乎很难解释 $1mM Mg^{2+}$ 对重建 H^+ -ATP 酶酶活会明显提高^[2,4]。何况小于 $12.5 mM Mg^{2+}$, 对脂质体大小与形成脂酶体的量并没有产生明显的影响。

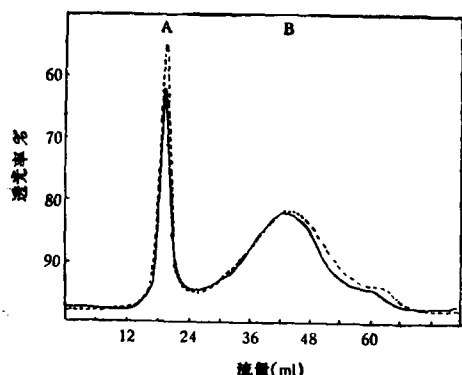


图8 Mg^{2+} 对嵌有 H^+ -ATP 酶的脂酶体重建的影响
——不含 Mg^{2+} ----含 $12.5mM Mg^{2+}$

综上所述, H^+ -ATP 酶重建对脂质体大小有一定的选择性, 它倾向于在较大脂质体上进行重建。 Mg^{2+} 提高重建 H^+ -ATP 酶酶活, 看

来主要并不是影响脂质体大小,从而增加脂酶体的形成。

本文所用的猪心线粒体 H^+ -ATP 酶系本所张淑秀同志制备提供,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉等:《生物化学与生物物理学报》, 12, 193—2000, 1980。
- [2] 杨福愉等:《中国科学》, 1, 86—91, 1981。
- [3] Kagawa, Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 246, 5477 1971.
- [4] Eytan, G. D. et al. *J. Biol. Chem.*, 251, 6831—6837, 1976.
- [5] Sone, N. et al., *J. Biochem.*, 81, 519, 1977.
- [6] 李才元等《膜分离科学与技术》, 11, 1—7, 1982。
- [7] Bartlett, G. R.: *J. Biol. Chem.*, 234, 466—468, 1959.
- [8] 潘家秀等《蛋白质化学技术》, 28, 1973, 科学出版社。
- [9] Nejat Duzgnes, et al.: *J. Membr. Biol.*, 59, 115, 1981.
- [10] Rehfeld, S. J. et al.: *FEBS Letters*, 123, 249, 1981.
- [11] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 241, 2475, 1966.
- [12] Eytan, G. D. et al.: *FEBS Letters*, 85, 175, 1978.

[本文于1983年3月25日收到]

两种不同蛋白质在兔体内代谢率及免疫性的比较

李 刚 杜 国 光 刘 思 职

(北京医学院生化教研室)

抗原性何以有强有弱,一向受到生物学家和医学家的重视。众所周知,同一抗原在甲种动物中为一强抗原,而在乙种动物中可为弱抗原;不仅同种动物的不同个体对同一抗原的反应可表现强弱程度不同,甚至同一个体在不同生理、病理状态,也可表现有不同强弱的反应。究其原因是多方面的。早年人们多认为抗原性的强弱只与抗原本身的结构特征有关。最近,又多侧重于机体反应性的差异,认为主要和机体的免疫识别机制,以及抗体生成的调节机构有关。我们认为引起抗原性强弱的原因很复

杂,事物的两个方面——抗原与抗体,均不容忽视。说明这个问题,在理论上和实践上都有一定的意义。我们拟从不同抗原在体内代谢率的高低着手进行探讨。

我们以兔为对象,选择两种结构不同的蛋白质,即鸡蛋清蛋白(下简称EA),和狗血红蛋白(下简称Hb)进行对比研究。人们早已熟知,EA对兔是一种强抗原;而Hb乃系弱抗原^[1,2]。比较它们在兔体内代谢率的差异,将有助于进一步探讨抗原性强弱与其在体内存留的关系。