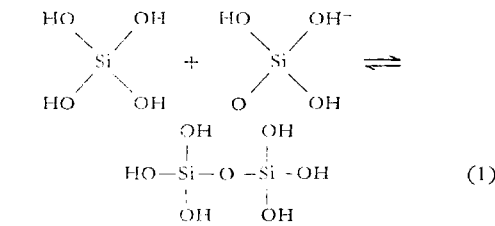


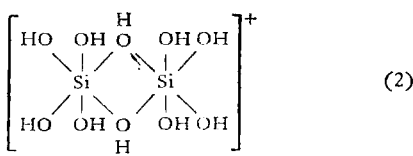
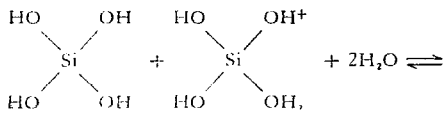
从层析结果可以看出,在 pH3 或 4 所制的硅胶,无论在非水系统或含水系统,分离染料、氨基酸、多肽、 R_f 值、展层速度、灵敏度、分辨力均接近于 E. Merck 硅胶 H。各层析斑点显色深,退色慢。制备硅胶所用的 pH 离 3 越远,层析分离效果越差,斑点扩散,拖尾,分辨力和灵敏度低,显色浅,容易退色。

讨 论

层析硅胶是一种多孔性凝胶,其骨架和孔穴特性是影响层析行为的重要因素。其分子是由硅原子周围接氧原子的四面体结构单元组成,以此交联成环状的硅氧烷基团或者 Si-O-Si 桥,在高聚硅胶中以 -SiOH 为末端。硅胶在不同 pH 条件下,聚合所形成的硅胶性质不同。我们用不同的 pH,从 pH 1—2 至 pH 7 制备一系列的硅胶,经薄层层析分析鉴定,以 pH 3—4 (一般控制在 pH 3) 所制备的硅胶质量最好。它介于粗、细孔硅胶之间。在碱液和稀酸液内,原硅酸与其一价阴离子聚合:



在浓酸溶液内原硅酸和 H_5SiO_4^+ 聚合:



前一种聚合反应(1)中,产物的硅配位数为 4,后者(2)产物的硅配位数为 6。这二种配位数共同支配着胶粒的堆积方式。这是决定硅胶骨架特性(如: -SiOH 基团的分配)及孔穴特性(如: 比表面、平均孔直径的大小)的主要因素之一。在浓酸溶液内形成细孔硅胶,在碱液或稀酸液内形成粗孔硅胶。在 pH1.5—4.5 之间,二种聚合作用同时进行。pH3 时二个反应物浓度乘积之和 $-\log([\text{H}_4\text{SiO}_4][\text{H}_3\text{SiO}_4^-] + [\text{H}_5\text{SiO}_4^+][\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}])$ 达到最大值。此时 $[\text{H}_3\text{SiO}_4^-] = [\text{H}_5\text{SiO}_4^+]$ 二种聚合有同等重要性。

由此可以推测,在 pH3 附近所形成的硅胶介于典型的粗孔和细孔之间,我们以比表面积、平均孔直径、视比重等指标,证实了这种推测(表 2)。

表 2 几种硅胶的性状比较

硅 胶	典型细孔硅胶	E. Merck 硅胶 H	自制硅胶 (pH3—4)	典型粗孔硅胶
性 状				
比表面积(米 ² /克)	770—830	381	406	330—350
平均孔直径(埃)	22—26	介于中间*	介于中间	100—150
视比重(克/升)	670	450	470	400—500

* 根据硅胶电镜照片计算结果,生化所钱力,上海计量局陆一宁担任电镜观察。特此致谢。

[本文于 1978 年 11 月 23 日收到]

猪心线粒体 ATP 酶复合体 F_1F_0 的分离与重组

赵 云 鹏 张 淑 秀*

(中国科学院生物物理研究所)

线粒体内膜上的 ATP 酶是一个复杂的复合物,分子量为 360,000,含有 30% 磷脂。它受 Mg^{++} 离子激活,并对能量转移抑制剂(寡霉素,芸香霉素等)敏感,ATP 酶是线粒体能量转换

的主要装置。线粒体在呼吸过程中逐步释放的能量大部分都是由 ATP 酶转化成 ATP 的形式

* 科大吉永华同学参加部分工作。

贮存起来,以供细胞使用。

线粒体 ATP 酶主要由三部分组成: F_1 (可溶性 ATP 酶,头部)、 $oscp$ (赋予寡霉素敏感性蛋白,柄部)及 F_0 (疏水蛋白,基部)。

Rackev^[1] 和 Kagawa^[2] 在线粒体 ATP 酶的析离和重组方面作了不少工作,他们认为 F_1 重新结合到基部时,再加入纯化的 $oscp$ 能使重组活性提高。

在 Slater 实验室工作的 Vallejos 从线粒体丙酮干粉中抽提出了一个叫做 F_1X (即 F_1-oscp) 的可溶性偶联因子,它的 ATP 酶活性与 F_1 极相似,但偶联活性更高。而他使用的方法比其他提取 $oscp$ 的方法要简便。本文用 Vallejos 方法从线粒体丙酮干粉中分离 F_1X ,并将其与嵌有 ATP 酶复合体基部 (F_0) 的脂质体进行重组以鉴定其活性。

实 验 方 法

1. 线粒体制备 材料为新鲜猪心。除了肉糜洗涤液改为 0.125M 氯化钾、0.001M EDTA* (pH7.5) 以外,其余步骤基本按 Green^[3] 方法操作,所得线粒体悬液于干冰中冷冻保存。

2. 丙酮干粉的制备^[4] 将冷冻的线粒体悬液融化后,加入约 20 倍体积预冷 (-30°C) 的丙酮(重蒸)。搅拌 5 分钟以后于 $1100\times g$ 离心 5 分钟。上清液弃去,将沉淀加入少许冷丙酮,于高速组织捣碎机中捣碎 10 秒 (4500rpm/分)。然后加丙酮至第一次体积,搅拌 5 分钟后于 $1100\times g$ 离心 5 分钟,沉淀用少许冷丙酮洗出,进行抽滤。再用约 100 毫升冷无水乙醚洗涤,沉淀在真空干燥器中经 3 小时真空泵抽气,去除残余丙酮乙醚后,再于冰箱中保存。

3. F_1X 制备^[5] 线粒体丙酮干粉加水匀浆 (按 40—50 毫克/毫升)后,超声处理 2 分钟 (国产 CFS—250—5 超声波发生器,电流 300mA,最大输出功率)即于 $12000\times g$ 离心 10 分钟,收集上清液,测酶活,定蛋白含量,重复处理四次,将上清液合并后,于 $105,000\times g$ 离心 30 分钟,得淡黄色透明溶液,加入等体积的饱和硫酸铵 (pH7.4) 搅拌 20 分钟后,于 $12,000\times g$ 离心 10

分钟,收集沉淀,溶于 0.25M 蔗糖 10mM Tris- SO_4 (pH7.4) 和 1mM EDTA 溶液中,使蛋白含量为 5—10 毫克/毫升,再于室温下 $12000\times g$ 离心 10 分钟,除去杂质,即为 F_1X 溶液。最后制成饱和度 50% 硫酸铵、2mM ATP 溶液 (pH7.4),放冰箱保存。

4. Sephadex G-100 凝胶过滤^[6] 超细 Sephadex G-100 处理后装柱 ($2\times 50\text{cm}$), 用 25mM Tris-醋酸 (pH7.5) 和 1mM EDTA 的缓冲液平衡, F_1X 样品用 0.25M 硫酸铵及去氧胆酸钠 (0.1 毫克/毫克 F_1X 蛋白) pH8.0 预处理。洗脱液为含有 0.25M 硫酸铵及 0.1% 去氧胆酸钠的平衡缓冲液。用 LKB 部分收集器收集,用紫外光源监测洗脱结果,分别收集二个峰的洗脱液,并作凝胶电泳分析。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Takayama^[7] 方法进行。

6. 酶活性测定^[8] 按 ATP 在酶作用下水解所释放的无机磷量计算。测定系统内含有: 50mM Tris- SO_4 (pH7.5), 6mM ATP, 3mM 硫酸镁,酶量 10—500 微克。用钼酸铵法在 660 毫微米波长比色测定无机磷含量。用 ATP-再生系统时,再加丙酮酸激酶 32 微克蛋白量,磷酸烯醇丙酮酸 2 微克分子 (pH8.2)。

7. F_1X 与 LF_0 的重组^[1] 采用透析法,先将疏水蛋白与脂质体按疏水蛋白与透析液体积之比为 1:100 透析 20 小时,透析液每 1000 毫升含 1.21 克 Tris-Cl, 0.111 克 EDTA, 0.046 克 DTT, 55 毫克 ATP (pH8.0) 和 20% 甲醇。

透析后形成的 LF_0 按比例加 F_1X , 然后于 25°C 保温半小时,再于 0°C 放置 2.5 小时,按 ATP-再生系统测定 ATP 酶活性。

结 果 与 讨 论

1. ATP 酶复合体 F_1X 部分的分离 按所述方法制备的猪心线粒体 ATP 酶比活力为

* 本文所用缩写: EDTA 是乙二胺四乙酸; ATP: 腺三磷; Tris: 三羟甲基氨基甲烷; DTT: 二巯基苏木醇; TUA 颗粒是用胰蛋白酶、尿素和氨处理过的线粒体颗粒。

0.2, 寡霉素抑制 70%, 丙酮干粉 ATP 酶比活力稍有下降, 且对寡霉素不敏感(表 1)。这说明 ATP 酶复合体经丙酮处理后仅使复合体的三部分之间的结合及复合体与膜间的结合松散、弱化, 因而丧失寡霉素敏感的性质, 但其基本结构还未发生变化, 因而酶活性仍能维持在正常水平。这一点恰好有利于复合体各部分的分离。

表 1 线粒体和丙酮干粉 ATP 酶活力

ATP 酶	酶活	比活力 微克分子磷/毫克蛋白/分		
		次数		
		第一次	第二次	第三次
线粒体	不加寡霉素	0.20	0.07	70%
丙酮干粉	不加寡霉素	0.15	0.16	0—10%

丙酮干粉用水抽提 F_1X 时, 超声的功率、温度以及超声后离心的速度都与 F_1X 的 ATP 酶比活性有关。表 2 显示超声功率的影响。超声功率过大 (240 瓦) 不仅将 F_1X 从复合体上分离下来, 而且可能将 F_1X 分离成亚单位而使酶活性丧失, 以至在第三、四次抽提液中测不出酶活性。当超声功率降为 60 瓦时, 抽提液中 F_1X 的 ATP 酶比活在第一、二次抽提时稍有升高, 第三、四次抽提液中则明显升高。而选择一个既能从复合体中分离出 F_1X , 又不使它的结构受到破坏的超声条件是分离效果好坏的关键之一。

表 2 超声条件对抽提液中 ATP 酶活的影响

超声功率	次数	比活力 微克分子磷/毫克蛋白/分							
		第一次		第二次		第三次		第四次	
		-	+	-	+	-	+	-	+
240 瓦		0.18	0.18	0.13	0.13	0.08	0.08	0.07	0.07
60 瓦		0.20	0.20	0.16	0.15	0.16	0.15	0.16	0.16

注: - 不加寡霉素; + 加寡霉素

同时, 超声时的温度对抽提液中 F_1X 的酶比活性也有影响。从表 3 看出当超声功率为 60 瓦时在冰浴中超声所制备的 F_1X 的酶比活性比室温中的要低些。这可能是由于 F_1X 冷不稳定, 因而与基部分离后引起失活。

表 3 超声温度对抽提液中 ATP 酶活的影响

超声功率	次数	比活力 微克分子磷/毫克蛋白/分							
		第一次		第二次		第三次		第四次	
		-	+	-	+	-	+	-	+
冰浴		0.20	0.21	0.16	0.15	0.16	0.15	0.16	0.16
室温		0.23	0.22	0.21	0.20	0.19	0.17	0.20	0.18

注: - 不加寡霉素; + 加寡霉素

因为 F_1X 是可溶性的, 因而丙酮干粉室温下超声抽提后, 提高离心速度, 以便尽量减少悬浮液中的丙酮干粉颗粒和其他杂蛋白, 结果是酶的比活性明显提高, 尤其第三、四次抽提液中酶比活提高更为显著(表 4)。

表 4 离心速度对抽提液中 ATP 酶活的影响

离心速度	次数	比活力 微克分子磷/毫克蛋白/分							
		第一次		第二次		第三次		第四次	
		-	+	-	+	-	+	-	+
3600 × g		0.23	0.22	0.21	0.20	0.19	0.17	0.20	0.18
12000 × g		0.28	0.28	0.33	0.33	0.37	0.37	0.32	0.33

注: - 不加寡霉素; + 加寡霉素

F_1X 也是冷不稳定的偶联因子, 从图 1 可以看出 F_1X 对不同温度的敏感性不同。

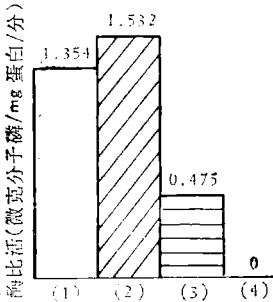


图 1 不同温度对 F_1X 酶活的影响

(1) 室温, (2) 25°C 保温 1.5 小时后, (3) 0°C 放置 1.5 小时后, (4) 0°C 放置 2.5 小时后

F_1X 经硫酸铵及去氧胆酸钠处理以后, 再用 Sephadex G100 凝胶过滤方法可将它分离成二部分。记录仪上出现二个大小不等的峰, 而未经处理的 F_1X 凝胶过滤后只有一个峰(图

2)。从聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(图3)看出, F_1X 主要呈现五条带。

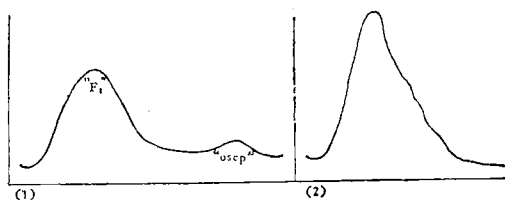


图2 F_1X 经 Sephadex G100 凝胶过滤后的洗脱图

(1) 经硫酸铵及去氧胆酸钠处理 (2) 未经处理

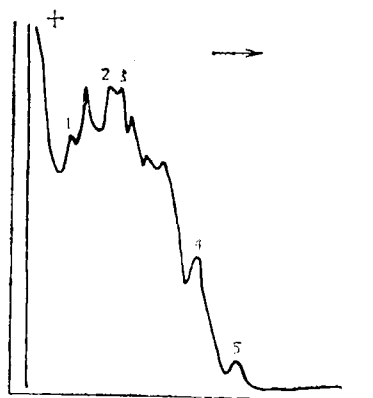


图3 F_1X 聚丙烯酰胺凝胶扫描图

扫描波长 560 毫微米

2. ATP 酶复合体 F_1X 部分与 LF_0 的重组

为进一步测试 F_1X 的功能, 还将它与嵌有 F_0 的脂质体 (LF_0) 进行重组, F_1X 与 F_1 一样对冷是不稳定的。但与 LF_0 结合后, 就具有对冷稳定的性质。因而重组后先用冷冻的方法使未结合的 F_1X 部分酶活丧失, 这时所测的酶活性大小即为重组程度的标志。实验结果表明(图4), 当 LF_0 与 F_1X 的浓度比为 4:1 及 2:1 时, 重组后 ATP 酶比活性恰好等于 LF_0 与 F_1X 的酶比活之和。

此外, F_1X 对寡霉素是不敏感的, 当它与 LF_0 重组成为膜结合的 ATP 酶复合体时, 酶活性就会受到寡霉素的抑制。因而 F_1X 重组后酶活受寡霉素抑制的程度也是反映重组成功的标志之一。从图4可以看出 F_1X 与 LF_0 重组后不仅酶的总活力相应提高, 而且受寡霉素抑制的部分不变甚至稍有提高, 这进一步说明 F_1X 与 LF_0 重组已经成功。

根据 Kagawa 实验结果^[2], 当 ATP 酶复合

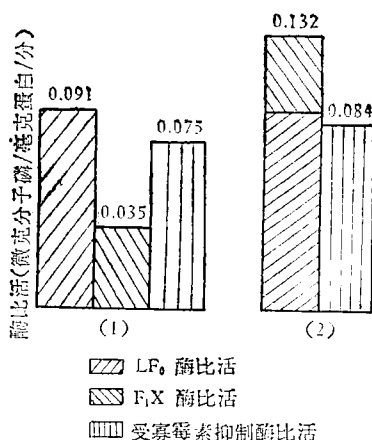


图4 F_1X 与 LF_0 重组前后酶比活及受寡霉素抑制程度的比较

(1) 重组前 (2) 重组后

体在脂质体上重组时, 加入 $oscp$ 稍能增加重组后 ATP 酶复合体的总活力。 F_1X 是 F_1 与 $oscp$ 的复合物, 根据我们的结果并比较 F_1 与 F_1X 的重组情况还很难看出明显的差异。此外, 一些报道中还提出 F_1 与 F_0 结合时, 除了 $oscp$ 以外还要有另外一个因子。 Vidineanv, A. (1976) 称此因子为 $F_2(F_0)$ (用硫氰化物和硅钨酸盐从 TUA 颗粒中提取出来的第二个因子); Leland, K.^[9] 称它为结合蛋白。二人均已分离出这种因子。因此在 ATP 酶复合体的重组过程中如果要获得较高酶活除 LF_0 和 F_1X 外, 可能还要考虑一些其他因子和寻找较理想的重组条件。

参 考 文 献

- [1] Serrano, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 251, 2453, 1976.
- [2] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 246, 5477, 1971.
- [3] Green, D. E., et al.: *Methods in Enzymology*, VI, 418, 1963.
- [4] Ruben, H. Vallejos, S. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 511, 1968.
- [5] Fessenden, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 241, 2484, 1966.
- [6] Van De Stadt, R. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 267, 25, 1972.
- [7] Takayama, K. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, 114, 223, 1964.
- [8] Racker, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48, 1660, 1962.
- [9] Leland, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73, 434, 1976.

[本文于 1979 年 3 月 27 日收到]