

上,除原点峰和晶体学三重轴引起的最高峰外,最大值位于 $X = 180^\circ$, $\phi = 90^\circ$, $\varphi = 15^\circ$ (见图 2(a)),数值均为原点峰的 80%。这表明在三方二锌猪胰岛素晶体的一个晶体学不对称单位里,两个胰岛素分子以非晶体学二重轴相关,该二重轴与晶体学三重轴垂直,且与 a 轴成 15° 的夹角。这个结果不但与我们以前用同晶置换

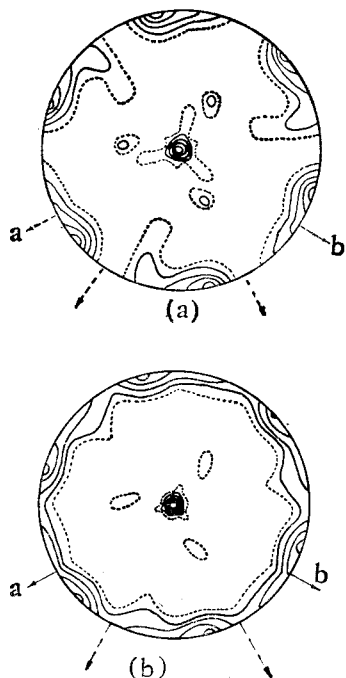


图 2 三方二锌猪胰岛素晶体旋转函数图
 $\kappa = 180^\circ$, 图中虚线箭头方向为非晶体学二重轴方向

法得到的晶体结构相符^[5],而且与霍奇金等人用同样方法获得的结果相一致^[6]。最近我们有幸得到了罗斯曼 (Rossmann) 的旋转函数 FORTRAN 语言程序的文本,并把它移植到 FELIX C-512 机器上,随后同我们的程序做了初步对比。图 2(b) 是使用 Rossmann 程序,用与上述模型检验相同的数据和相类似的计算条件,算得的三方二锌猪胰岛素晶体的自身旋转函数。从信息峰与原点峰以及同背景的比值等指标综合来看,两个程序的计算精度相当,据估算,我们的计算速度稍快,原因之一是罗斯曼 (Rossmann) 的程序采用了三斜晶系的通用形式。在天花粉蛋白质晶体的非晶体学对称性的研究中,采用 156 个 $|F_p|^2$ 大项和 27 个内层加和项,用我们的程序在 013 机上计算一个角度方位的 $R(C)$ 值约需 0.7 秒。

参 考 文 献

- [1] Rossmann, M. G.: *The Molecular Replacement Method*, 1972, Gordon and Breach, New York.
- [2] Rossmann, M. G. et al.: *Acta Cryst.*, **15**, 24, 1962.
- [3] 毕汝昌, 林政炯, 高义贵:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 第 12 期, 第 165 页。
- [4] Tollin, P. et al.: *Acta Cryst.*, **21**, 872, 1966.
- [5] 胰岛素结构研究组:《中国科学》(试刊), 1972 年, 第 1 期, 第 3 页。
- [6] Dodson, E. et al.: *J. Mol. Biol.*, **16**, 227, 1966.

[本文于 1980 年 10 月 16 日收到]

一种简便提纯猪心线粒体可溶性腺三磷酶 (F_1) 的方法

林治焕 乌 恩 孙 珊 许桂珍 张 克

(中国科学院生物物理研究所)

线粒体内膜 H^+ -ATP 酶的头部,又称为可溶性腺三磷酶,1960 年 Racker^[1] 确定它是氧化磷酸化的偶联因子 1 (F_1) 并首次自牛心线粒体中提纯,之后,从不同生物不同组织如鼠肝,酵母的线粒体、植物细胞的叶绿体、原核细胞如耐热菌、大肠杆菌的质膜中都得到了提纯的 F_1 。提纯这些 F_1 所用的方法虽各不相同但一般都较复杂费时^[2-5],我们采用简便快速的方法从猪心

线粒体提纯 F_1 , 并对它的催化特性、化学组成以及荧光性质等进行了测定与分析。

一、材料与方 法

1. 猪心线粒体的制备 按 Green and Zeigler 方法作了修改^[6]。

2. ATP 酶活力的测定 是测定酶在 0.5 毫升[内含 Tris-马来酸 pH 8.0, 42mM, $MgSO_4$,

2.5mM, ATP 6mM, PEP (磷酸烯醇式丙酮酸) 2 μ moles, PK (丙酮酸激酶) 60 μ g, KHCO₃ 20mM] 的介质中释放 Pi 的量, 反应在 30℃ 进行, 加酶液开始计时。用 5% 三氯醋酸 0.5 毫升停止反应, 所加酶液量与反应时间可根据活力大小而定, 在这反应介质中, 可测的 ATP 活力单位为 0.1—0.4, ATP 酶比活力是在此实验条件下每 mg 酶蛋白每分钟使 ATP 水解的 μ moles, 即用 μ moles Pi/分钟/mg 蛋白表示。

3. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Klans Weber 和 Mary Osborn 方法^[7]

4. 无机磷测定 按 Fiske 和 Subba Row 方法。

5. 蛋白质浓度的测定 按 Folin-酚方法^[8]

6. Oligomycin A 为 A Grade Calbiochem 产品。

二、结果与讨论

1. 可溶性 ATP 酶的提纯

除注明须冷却外, 其它都在室温操作。

(1) Triton X-100 的处理 猪心线粒体是悬于 STE 介质(0.1M 蔗糖 0.01M Tris-SO₄, 0.001 MEDTA pH 7.4) 中, 使线粒体蛋白浓度为 15—25 mg/ml, 在冰浴中滴加 1% Triton X-100 (溶于 STE 介质中) 边加边搅, 使 Triton X-100 最后浓度达 0.25%, 加完后再搅 3 分钟, 以后用 2—3 倍体积的 STE 介质稀释之, 0℃—4℃ 超速离心(100,000 × g) 30 分钟, 沉淀中含有 H⁺-ATP 酶的线粒体内膜制剂。

(2) 在 pH 9 下, 用超声处理 上述沉淀用 STEA 介质 (STE 介质中含 4mM ATP) 匀浆使蛋白浓度为 10—15 mg/ml, 用氨水调 pH 到 9.0 在 26—27℃ 下放置 1 小时。每次取 50—80ml, 以最大输出功率超声 10—12 分钟 3 次, [用国产超声细胞破碎机 250CSF-76 型, 本溪市无线电一厂出品], 超声过程用自来水冷却, 使温度维持在 20℃ 左右, 超声后超速离心 (100,000 × g) 30 分钟收集上清液, 内含 F₁。

(3) 通过 (NH₄)₂SO₄ 沉淀提纯 F₁ 往 F₁ 溶液中滴加饱和 (NH₄)₂SO₄ 达 37.5% 饱和度, 调 pH 到 7.5, 搅拌 15 分钟, 15,000 × g 离心 15 分钟, 去除沉淀, 上清液继续滴加饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液使达 52.5% 饱和度, 调 pH 到 7.5, 在冰浴中搅拌 15' 后, 0℃—4℃ 15,000 g 离心 15 分钟, 收集沉淀 (F₁)。

(4) 65℃ 热处理 将沉淀 F₁ 溶于 TEA, 溶液 (Tris-SO₄ 50mM, EDTA 1mM, ATP 2mM, pH 7.4) 在 65℃ 水浴中加热 2 分钟, 15,000 g 离心 20 分钟, 去除不耐热的杂蛋白, 使 F₁ 进一步纯化。置于 55% (NH₄)₂SO₄ 饱和度和 4 mM ATP 中保存于冰箱中。

猪心线粒体一次提纯过程的结果列于表 1, 从表中可以看出: 在超声处理这一步, ATP 比活力的提高达 20 倍左右, 并且超声处理后总活力平均约增 10 倍左右, 这可能是由于超声将 ATP 酶上的抑制多肽解离出来从而释放了 ATP 酶的活力, 从超声波处理开始 ATP 酶活力就不受 Oligomycin 的抑制, 从线粒体提纯的 F₁ 蛋白

表 1 猪心线粒体可溶性 ATP 酶 (F₁) 的提纯

步 骤	蛋 白 量		ATPase 比活* (单位/mg 蛋白)	Olig 抑制%	总活力
	总蛋白 (mg)	回收%			
线 粒 体	1238	100	0.31	94.4	384.8
TritonX-100 处理	784	63.3	0.27	92.2	211.7
超声波处理	367	29.6	4.60	-3.1 ^Δ	1688.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	18.9	1.5	63.83	1.97	1206.4
热处理(65℃, 2')	11.78	0.95	99.29	-5.24 ^Δ	1169.6

* 酶活力测定方法详见材料与 方法, 反应 30℃, 30 秒—3 分钟, 测定时蛋白质加量: 线粒体为 0.3—0.8 mg, TritonX-100 处理后为 0.3—0.6mg, 超声波处理后为 0.1mg 左右, (NH₄)₂SO₄ 沉淀后为 0.01mg 左右, 热处理后为 0.01 mg 左右, Δ“-”代表活力增加。

量约占原始线粒体 1%，最后所得 F_1 的比活达 100 左右。

2. 可溶性 ATP 酶的催化特性，化学组成与内源荧光特性

(1) 提纯的猪心 F_1 其催化作用除不受 Oligomycin 抑制外，尚有对冷不稳定性。如在 0℃ 左右放置 70—80 分钟，其活力可下降 80% 左右，结果见表 2。

表 2 冷却对 F_1 的影响

实验编号	实验条件	ATPase 比活力 (单位/mg 蛋白)	ATPase 活力下降 %
1	室温(16—18℃), 70'	95.75	88.2
	0—-1℃, 7.0'	11.26	
2	室温(16—18℃), 70'	80.18	75
	0—-1℃, 70'	20.04	

(2) SDS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 图 1 显示出猪心 F_1 解聚后含有五种亚基 A、B、C、D 与 E，其中 A 与 B 亚基的峰十分接近，这与用其它方法所制备的牛心或猪心 F_1 SDS-凝胶电泳的扫描图谱一致。除此也有 B' 峰^[9]的出现。

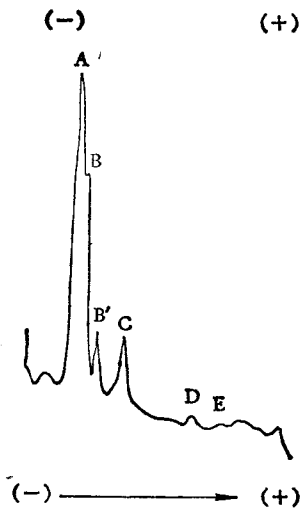


图 1 猪心 F_1 在有 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析图谱
样品量 60r 在 1% SDS 中解聚。分离胶用考马氏亮兰染色，在分光光度计上扫描， λ_{550nm} ，速度为 4cm/min

(3) 猪心 F_1 的氨基酸分析 从表 III 看出我们分析的牛心 F_1 与文献报道接近，并且猪心

F_1 与牛心 F_1 氨基酸的组成上无很大差异。

(4) 猪心 F_1 的内源荧光光谱: F_1 的内源荧光光谱是 F_1 的特性之一^[10]， F_1 的荧光发射峰与激发波长有关，当激发波长从 270 nm 向 300nm 移动时， F_1 的发射峰从 305 nm 逐步移向 334nm (见图 2) 这表明 F_1 的氨基酸组成中有酪氨酸与色氨酸的存在，因为当激发光波长 > 290nm 时，酪氨酸的荧光强度很低，只有色氨酸吸收此能量，从图 3 可见，当激发波长增加到 290 nm 以上，334 nm/310nm 荧光发射强度之比激增，表明 F_1 分子中色氨酸的存在，而色氨酸在一般的氨基酸分析中是不能测出的。

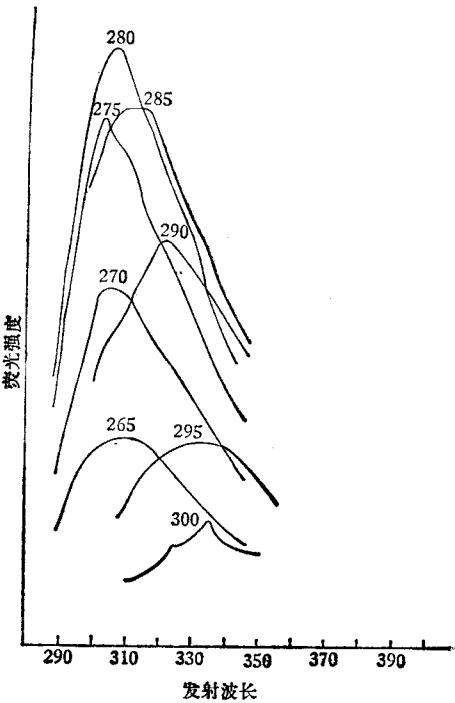


图 2 猪心线粒体 F_1 的荧光光谱

猪心 F_1 (约 120μg 蛋白) 在 1ml 缓冲液中(含 40 mM, HEPES-KOH 1 mM EDTA, pH 7.7)。在本所工厂自制荧光分光光度计上测定，激发波长从 265 nm—300nm，每一激发波长下，测其发射光谱从 290 nm—350nm，图中每一根曲线代表每一种的激发光波长。

提纯的猪心 F_1 ，除用上述各指标鉴定外，尚成功的用于重组在脂质体上，恢复了对 Oligomycin 的敏感性 & ^{32}P -ATP 交换的功能^[11] 以及用于抗血清的制备^[12]，并且还可用于制备 F_1 的结晶^[13]。

关于线粒体内膜上可溶性 ATP 酶提纯的

表3 猪心与牛心线粒体F₁氨基酸组成的比较

氨基酸	猪 心	牛 心	牛心 (抄自 Enzymes of Biological Membranes Vol. 4)
	克分子% (mole%)	克分子% (mole%)	克分子% (mole%)
天门冬氨酸	8.88	8.76	9.35
苏氨酸	5.41	5.48	5.72
丝氨酸	6.00	6.37	6.66
谷氨酸	13.77	14.35	12.61
甘氨酸	9.27	9.26	8.65
丙氨酸	10.32	10.47	9.67
缬氨酸	7.64	7.34	7.39
甲硫氨酸	1.51	1.31	1.02
异亮氨酸	5.78	5.73	5.70
亮氨酸	8.74	8.84	9.96
酪氨酸	1.97	2.16	2.80
苯丙氨酸	2.95	2.86	3.54
赖氨酸	6.18	6.17	5.75
组氨酸	1.69	1.55	1.47
精氨酸	5.22	5.32	4.68
脯氨酸	4.60	3.93	5.03

猪心F₁与牛心F₁分别在6NHCl中110℃进行水解22小时,水解过程中色氨酸破坏,表中是二次实验的平均。

* 本实验结果由本所氨基酸分析小组测定,特此致谢。

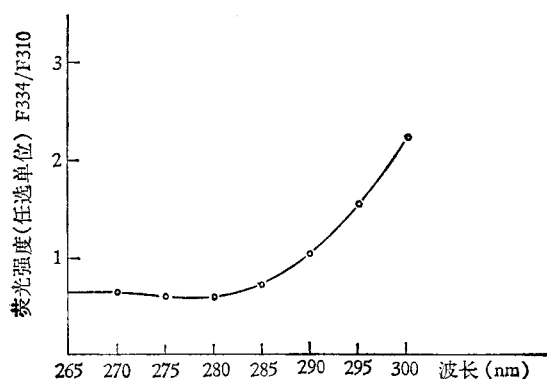


图3 猪心线粒体F₁的荧光强度(F₃₃₄/F₃₁₀)与激发波长的关系

方法,文献中报道的很多,大多数方法复杂费时,并且原始材料常需大量的线粒体或亚线粒体,我们采用的方法简便快速,只需500 mg线粒体蛋白即可制备,如从线粒体开始制备,当日可得提纯的F₁,虽然1957年Beechey^[14]也曾报道过用氯仿抽提牛心亚线粒体F₁的快速方法,但F₁纯度较低,表现为比活力低并且没有对冷不稳定的特性。用本法制备的猪心F₁的特性鉴定结果与文献报道的一致。这方法同样可用于牛心线粒体F₁的提纯。

参 考 文 献

- [1] Pullman, M. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 3322.
- [2] Senior A. E. et al.: *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1970, 140, 257.
- [3] Jan Kopecky, et al.: *Mol. and Cell. Biochem.*, 1977, 18, 2—3.
- [4] Drahota Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1977, 460, 541—546.
- [5] Attilio Di Pietro. et al.: *Biochimie.* 1975, 57, 959—967.
- [6] 中国科学院生物物理研究所线粒体小组:《线粒体的分离与活性测定方法》1980年,科学出版社。
- [7] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406.
- [8] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》科学出版社,1962年版。
- [9] Pedersen, P. L. et al.: *Energy Conservation in Biological Membranes.* by G. Schäfer and M. Klingenberg, Springer-Verlag Beilin Heidelberg New York. 1978.
- [10] Keira, T. et al.: *Experientia*, 1978, 34/12, 1548.
- [11] 杨福愉等:《生物化学与生物物理学报》第12卷,第2期,1980年6月。
- [12] 林治煥等:不同细胞来源的F₁-腺三磷酶的进化比较,待发表。
- [13] 林治煥等:猪心线粒体可溶性ATP酶(F₁)的结晶,待发表。
- [14] Beechey, R. B. et al.: *Biochem. J.* 1975, 148, 533.

[本文于1980年12月27日收到]