

表3 MΦ 质膜囊泡和 MΦ 匀浆各标志酶活性比较(分⁻¹·毫克蛋白⁻¹)

	质 膜 囊 泡	匀 浆	质膜囊泡/匀浆
5'核苷酸单脂酶	1.9 n mol. pi	0.13 n mol. pi	14
NADH ₂ 脱氢酶	0.38 μmol. NADH ₂ 被氧化	17.5 μmol. NADH ₂ 被氧化	0.021
琥珀酸-细胞色素 C 还原酶	~0 μmol. 细胞色素 C 被还原	1.0 μmol. 细胞色素被还原	~0

三、MΦ 质膜囊泡的纯度鉴定

鉴定质膜纯度的指标一般选用细胞质膜和细胞器的标志酶。本文选用 5' 核苷酸单脂酶作为质膜的标志酶,琥珀酸-细胞色素 C 还原酶作为腺粒体的标志酶, NADH₂ 脱氢酶系作为内质网的标志酶^[6]。MΦ 质膜囊泡和 MΦ 匀浆中上述各酶的活性见表 3。

上述结果说明,用贴壁培养的方法可以得到纯度较高的 MΦ, MΦ 在多聚甲醛作用下,可以产生和释出质膜囊泡,方法较简便,细胞器粘连不严重。但得率较低,例如贴壁培养这一步要浪费大量 MΦ,纯化的 MΦ 在多聚甲醛作用下,释放的质膜囊泡也只占质膜的一小

部分,看来最后得到的质膜只占总质膜量的很少部分,因此这一方法可用于需要质膜量不大的研究工作。

参 考 文 献

- [1] 胡世真等:《生物化学与生物物理学报》,1979 年,第 11 期,第 279 页。
- [2] Scott, R. E.: *Science*, **194**, 743, 1976.
- [3] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.
- [4] Tisdale, H. D.: *Methods in Enzymol.*, **10**, 213.
- [5] Wallach, D. F. H. et al.: *Methods in Enzymol.*, **8**, 164.
- [6] Hochstadt, J. et al.: *Methods in Membrane Biology*, **5**, 117.

[本文于 1979 年 12 月 5 日收到]

单倍体、双倍体酵母线粒体生物发生的研究

(I) 从葡萄糖阻遏到去阻遏过程中酵母线粒体内膜酶系的变化及在去阻遏过程中氯霉素的影响*

林治焕 李金照 赵云鹏 李才元 史宝生 孙珊 朱以桂**

(中国科学院生物物理研究所)

线粒体,这个重要细胞器,是供给细胞活动所需能量的“动力站”,其结构的特点是由内外二层膜组成的膜系,膜上有大量固有的和外在的蛋白质。它们很多是属于酶蛋白。自从 60 年代发现线粒体中有 DNA、RNA 以及自己独立的蛋白合成系统后,大大激发了人们研究线粒体中各种蛋白质来源的兴趣,因此线粒体的自主性与生物发生就成了活跃的研究领域之一。一般认为细胞线粒体的蛋白,有些是由线粒体的蛋白合成系统与核-质的蛋白合成系统协同合成的,另有些是由线粒体内自己的基因

编码合成的,但线粒体的这种自主性是极有限的。本工作的目的是通过单、双倍体酵母线粒体自主性的比较初步探讨线粒体生物发生过程中核-质与线粒体两个系统的相互关系。

兼性的酵母细胞,从无氧转移到有氧条件或从葡萄糖浓度较高(阻遏状态)转移到较低介质(去阻遏状态)中生长时,线粒体的数量和质量都发生剧烈的变化,在这些过程中至少线粒

* 此工作完成于 1974 年。

** 本工作是在杨福愉同志指导下进行。张克、张淑秀同志参加部分实验工作。

体经历了从结构与功能的不完整到完整的变化。这个过程是核-质和线粒体两个系统的协同结果。应用细胞质内蛋白质合成的专一抑制剂(如放线菌酮)或线粒体蛋白质合成的专一抑制剂(如氯霉素)就能反映出在生物发生过程中线粒体的自主性程度。我们采用了面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作实验材料,对单、双倍体酵母线粒体在上述情况下作了初步的比较。观察的线粒体功能指标是线粒体内膜上与呼吸链有关的酶或酶系如琥珀酸脱氢酶、琥珀酸-细胞色素 C 还原酶、还原辅酶 I-细胞色素 C 还原酶和细胞色素氧化酶等的变化,此外还对线粒体膜蛋白的变化作了初步探索。

材料与 方法

1. 酵母细胞的培养^[1]:

将单倍体酵母菌株(*S. cerevisiae* 2980)或双倍体酵母菌株(*S. cerevisiae* 2982)*接入种子培养基 600 毫升中(在 3000 毫升三角烧瓶内)28—30℃ 恒温,往复式摇床(270 rpm)振荡培养 24 小时。将此菌液每 40 毫升接入 600 毫升实验培养基中,同上条件振荡培养,每隔 1.5 小时取样测细胞的生长,呼吸以及培养基中葡萄糖浓度的变化。

种子培养基的制备 每 1000 毫升培养基中含:葡萄糖 8 克;蛋白胨 5 克;酵母浸出膏 10 克;KH₂PO₄ 9 克;CaCl₂ 0.33 克;MgSO₄ 0.50 克;(NH₄)₂SO₄ 6 克。

实验培养基的制备 配方同上,但因每 40 毫升种子菌液(葡萄糖浓度已降到零)加入到 600 毫升实验培养基中,为此,必须补加葡萄糖使其浓度保持在 0.8%。

2. 酵母细胞生长曲线的测定:

(1) 比浊法:用国产 72 型分光光度计测波长 550 nm 的光密度变化。菌液的培养时间少于 4.5 小时,可直接测其 O. D 550 nm,培养时间超过 4.5 小时,应适当稀释,稀释倍数随培养时间的增长而加大;以实验培养基作对照。

(2) 细胞计数法:即用血球计数法,但要

注意两点:(1)不同培养时间菌液稀释倍数不同,(2)整个过程应注意冷却,以免细胞继续繁殖。

(3) 干重法:用恒重的 G5 细菌漏斗过滤定量的菌液,抽滤干;用蒸馏水洗涤二次;漏斗放 105℃ 烘箱中烘至恒重为止(约 12 小时)。所取菌液量随培养时间的增长而减少。实验培养基作对照。

3. 测细胞水平的呼吸 用瓦氏呼吸器测定。

细胞悬液的制备 取定量的细胞培养液离心收集细胞,将其悬于 0.025M pH6.8 的磷酸缓冲液中。但取样量随培养时间而不同。

4. 细胞培养液中葡萄糖含量的测定^[2]

5. 酵母线粒体的制备^[3]

6. 线粒体蛋白质的测定^[4]

7. 酶活力的测定^[4]

(1) 琥珀酸脱氢酶的活力测定^[5,6] 琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸通过一系列的人工电子受体(如 PMS, DCPIP**)而被氧化,DCPIP 本呈蓝色,当被还原时蓝色消退,测定此反应系统在 600 nm 处的光吸收变化***,稀释线粒体使在测定过程中每分钟光密度变化在 0.05—0.20 之间 DCPIP 的消光系数为 21 mM⁻¹cm⁻¹。

(2) 琥珀酸-细胞色素 C 还原酶与还原辅酶 I-细胞色素 C 还原酶活力的测定^[5,6] 即测定反应系统在 550 nm 处光吸收的变化也就是测定细胞色素 C 被还原的速度。还原型细胞色素 C 的消光系数为:18.5 mM⁻¹cm⁻¹。

(3) 细胞色素 C 氧化酶活力的测定^[5,7] 测定还原型细胞色素 C 被氧化的速度即直接测 550 nm 处光密度的下降速度。

8. 线粒体膜蛋白的制备与分析

膜蛋白用胆酸盐及去氧胆酸盐增溶及差速离心分离,并用冷却的丙酮沉淀制成丙酮干粉^[8]。用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析其组成^[9]。

* 单倍体、双倍体酵母菌株由中国科学院微生物所菌种室提供。

** PMS (甲基酚噻甲硫酸盐) DCPIP (三氯酚吡啶)。

*** 意大利 CF4R 双光束分光光度计测定。

表 1 单、双倍体酵母细胞在不同条件下线粒体中几种酶活力的比较*

	葡萄糖阻遏状态		葡萄糖去阻遏状态		去阻遏过程中加 CAP**		从葡萄糖阻遏到去阻遏酶活力变化%		在 CAP 影响下酶活力变化%	
	单	双	单	双	单	双	单	双	单	双
琥珀酸脱氢酶 (μ moles 琥珀酸被氧化/分/mg)	0.040	0.039	0.161	0.145	0.194	0.203	↑ 302.5%	↑ 271.8%	↑ 20.5%	↑ 40%
琥珀酸-细胞色素 C 还原酶 (μ moles cyt. C 被还原/分/mg)	0.151	0.009	0.327	0.261	0.288	0.228	↑ 116.5%	↑ 2800%	↓ 11.9%	↓ 12.6%
还原 Col-细胞色素 C 还原酶 (μ mols cyt. C 被还原/分/mg)	0.515	0.166	1.047	1.354	0.713	0.571	↑ 103.3%	↑ 715.7%	↓ 31.9%	↓ 57.8%
细胞色素 C 氧化酶 (一级反应速度 K/分/mg)	0.352	0.228	25.21	0.962	10.99	0.733	↑ 706.3%	↑ 321.9%	↓ 56.4%	↓ 23.8%

** CAP 加量为 4 mg/ml 培养液*表中数据为数次实验结果的平均值 ↑ 表示酶活力升高 ↓ 表示酶活力降低

琥珀酸脱氢酶反应系统共 3 毫升内含: Na-pi-缓冲液 0.05M. (pH7.6). DCPIP 0.075 mM, PMS 0.0012M. KCN 0.0015M, 琥珀酸 0.009M, 及线粒体悬液(用 20% 蔗糖. pH6.8 稀释) 36℃

琥珀酸-细胞色素 C 还原酶与还原 Col-细胞色素 C 还原酶 } 反应系统共 3 毫升内含: Na-pi-缓冲液 0.024M (pH7.6) 叠氮 0.001M, 乙二胺四乙酸 0.002M. 细胞色素 C(Fe⁺⁺⁺) 50 μ M [浓度测定按 (10)], 琥珀酸 0.009M, 或还原 Col 0.0009M, 及线粒体悬液(用 0.25M 蔗糖. 0.024M Na-pi-缓冲液稀释) 30℃

细胞色素 C 氧化酶反应系统共 3 毫升, 内含: Na-pi-缓冲液 0.05M. pH7.0 还原型细胞色素 C [制备按 (11)] 加入反应系统要求 O.D._{550 nm} ≈ 0.6] 高铁氰化钾 0.0001M. 线粒体悬液(同上) 30℃

结果与讨论

从图 1 的酵母细胞的生长曲线可看出 3 小时以前是生长潜伏期, 3—6 小时是对数生长期, 6—9 小时又出现第二次的潜伏期, 9 小时以后又出现对数生长期。与 R. K. Mills^[1] 报道基本相同。用比浊法, 细胞计数法与称干重法所测得的细胞生长曲线是一致的。从图 1 中也可看到当具有高度呼吸能力的酵母细胞转接到新的含有 0.8% 葡萄糖的培养基中培养时, 细胞立即处于葡萄糖阻遏状态, 其 Q_{O_2} 急剧下降到零, 同时培养液中葡萄糖浓度也逐渐下降, 在 3—6 小时细胞的 Q_{O_2} 持续等于零, 但细胞繁殖很快。到 6 小时后葡萄糖浓度降到零, 这时, 细胞开始处于葡萄糖去阻遏状态, 随着其 Q_{O_2} 急剧上升可达原始的高度, 但从生长曲线看, 6 小时以后的细胞又处于第二潜伏期, 所以这时 Q_{O_2} 的上升可认为主要是由于原有细胞中线粒体的结构与功能渐趋完善的结果。以上结果, 单倍体与双倍体无明显差异。

从表 1 结果表明, 与葡萄糖阻遏状态相比

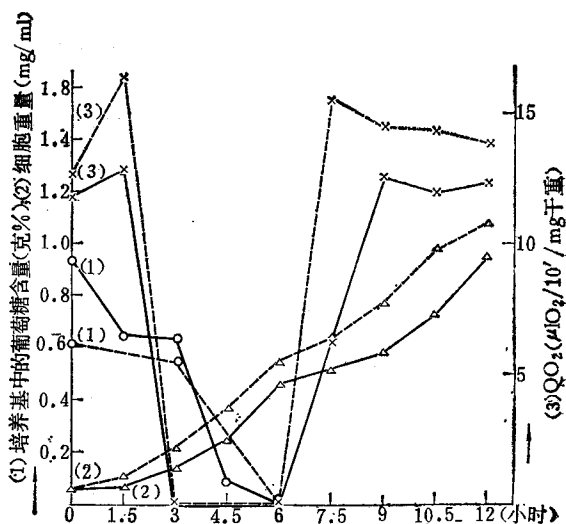


图 1 啤酒酵母在葡萄糖阻遏与去阻遏过程中的生长曲线以及呼吸能力的变化

—— 单倍体酵母细胞 (2980)
 双倍体酵母细胞 (2982)
 ×—× 在葡萄糖阻遏去阻遏过程中 Q_{O_2} 的变化
 ○—○ 培养液中葡萄糖含量的变化
 △—△ 生长曲线

较在葡萄糖去阻遏状态下琥珀酸脱氢酶、琥珀酸-细胞色素 C 还原酶,还原辅酶 I-细胞色素 C 氧化酶和细胞色素 C 氧化酶的活力均大幅度的增加,且与图 1 中葡萄糖去阻遏时呼吸剧增是平行的,说明这四种酶蛋白在葡萄糖去阻遏时在线粒体中的生物发生。在去阻遏过程中氯霉素的加入,使琥珀酸脱氢酶的活力明显增加,其它三种酶活均有不同程度的抑制,尤其是还原辅酶 I-细胞色素 C 还原酶与细胞色素氧化酶所受的影响更大。这说明除琥珀酸脱氢酶外,其它三种酶蛋白的生物发生都依赖于线粒体的蛋白合成系统。1973 年 Kim 和 Beattie^[5] 曾报道酵母线粒体细胞色素 C 氧化酶与还原辅酶 I-细胞色素 C 还原酶是由核-质与线粒体二种蛋白合成系统协同合成的,因此,氯霉素能抑制其合成而使活力下降,而琥珀酸脱氢酶与琥珀酸-细胞色素 C 还原酶的合成只依赖于核质的蛋白合成系统,因此氯霉素对这二种酶无影响,但在我们的实验结果中,琥珀酸-细胞色素 C 还原酶受氯霉素的影响而活力下降。这可能是由于这一酶系中,细胞色素 b 是由线粒体合成所致。Tzagaloff^[12] 的研究结果指出,酵母线粒体琥珀酸-辅酶 Q 还原酶与还原辅酶 I-辅酶 Q 还原酶的生物合成都不依赖于线粒体的蛋白合成系统,而还原辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶则需要线粒体与核-质二个系统核糖体的翻译产物,因此与我们的结果相同,即琥珀酸-细胞色素 C 还原酶与还原辅酶 I-细胞色素 C 还原酶同样都受氯霉素的抑制作用。

另一值得注意的实验结果是琥珀酸脱氢酶的活力,在氯霉素影响下反而升高。Küntzel^[13] 等人的研究结果是链孢霉线粒体的核糖体,由核基因编码在细胞质内合成;在有氯霉素存在下,这个由核质系统合成的线粒体蛋白,不仅不受抑制反而被刺激升高。作者推测核质编码合成的线粒体蛋白又受线粒体中一种或多种阻遏物所控制,而这些阻遏物是由线粒体的蛋白合成系统所合成,所以氯霉素也抑制了这些阻遏物的合成,而解除了对核质蛋白合成系统的控制。另 Weiss^[14] 等在提取链孢霉线粒体的琥珀

酸-辅酶 Q 时,培养液中加入氯霉素,此酶的活力也反而增高。因此,我们的结果中琥珀酸脱氢酶活力的升高,可反映出酵母线粒体生物发生过程中核质与线粒体二个系统相互依存相互制约的复杂关系。以上这些结果,对单双倍体酵母线粒体来说都没有明显差别。

此外,用凝胶电泳初步证明单双倍体酵母细胞线粒体内膜蛋白均可明显的分为九个部分,这些部分没有明显的定性差异。

从以上研究结果初步表明单、双倍体的酵母细胞线粒体的生物发生与自主性没有什么差异。1974 年 Perlman^[15] 等人的研究也指出,平均每个双倍体酵母细胞所含线粒体的数目,是每个单倍体细胞的倍数,其线粒体的基因组总数约为单倍体的两倍,因此,无论单、双倍体的酵母细胞中,平均每个线粒体所含基因组的数目是相等的,这也意味着单、双倍体酵母线粒体对蛋白质的编码能力是相同的。

总之,线粒体的生物发生是远未解决的问题,酵母细胞线粒体内膜上参加氧化磷酸化的一系列酶蛋白组成究竟那些是由线粒体本身合成?那些是由核质与线粒体协同合成的?这两个系统相互依赖、相互制约是很复杂的问题,目前有关酶的生物合成的报道往往是互相矛盾的。但一般都认为由线粒体本身合成的蛋白质为数不多,且多为膜结构上的疏水蛋白,目前已肯定的只有:ATP 酶复合体的四种亚基成分,细胞色素 C 氧化酶的三种亚基成分,以及细胞色素 b 等。

参 考 文 献

- [1] Mills, R. K.: *Aspects of Yeast Metabolism* 1967.
- [2] Keilin, D. et al.: *Biochem. J.*, 42, 230, 1948.
- [3] 陈受宜等, 未发表。
- [4] 潘家秀:《蛋白质分析技术》。
- [5] In-Cheol Kim et al.: *Eur. J. of Biochem.*, 36, 518, 1973.
- [6] Arrigoni, O. et al.: *Nature*, 193, 1256, 1962.
- [7] Lucile Smith *Methods of Biochemical Analysis*, 2, 427, 1955.
- [8] Tuppy, H. P. et al.: *Eur J. of Biochem.*, 5, 339, 1968.
- [9] Takayama: *Arch. Biochem. Biophys.*, 114, 223, 1966.

[10]

微生物资料汇编第四集,中国科学院微生物所编,p30, 1972。

[11]

Horton, A. A.: *Analytical Biochemistry*, **23** (2) 334, 1968.

[12]

Tzagoloff: *Ninth International Congress of Biochemistry*, Stockholm, 1—7 July 250, 1973.

[13]

Barath et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1371, 1972.

[14]

Weiss, et al.: *Eur. J. Biochem.*, **99**, 139, 1979.

[15]

Grimes, W. et al.: *J. of Cell Biology*, **61**, 565, 1974.

结合标记抗原和游离标记抗原的聚乙二醇分离法

邓守真 何婉婷 林祥通

(上海第一医学院华山医院同位素室)

我室应用放射免疫测定技术时曾采用双抗体分离方法,以后又研究了聚乙二醇 (Polyethylene glycol 简称 PEG, 分子量 6000) 在半抗原物质 (T_1 、 T_4) 及多肽激素(HCG)等放射免疫测定系统中对 B/F (结合比率)之影响。结果表明,分离效果与 PEG 的最终浓度,反应液中丙种球蛋白含量, pH 值, 离子强度有关;当 PEG 最终浓度为15%,反应液中待测血清含量为 25—100 微升时, B/F 值变化不大,且测定系统的非特异性沉淀亦较低(少于 10%);当 PEG 最终浓度低于 15% 时, PEG 液的 pH 值及离子强度对 B/F 值无明显影响,当 PEG 最终浓度大于 15% 时, B/F 值与 pH 值, 离子强度呈相反关系。故在 T_1 、 T_4 及 HCG 等的放射免疫测定系统中, PEG 分离效果于中性偏碱条件下为佳。

本组实验 PEG 的最终浓度是 15%、反应液中人血清为 100 微升,样品测定值的重复性观察,结果批内重复性良好,三种激素变异系数均在 5% 以内。同时,还观察了加入 PEG 后至离心去除上清液的时间间隔对 B/F 值的影响。加入 PEG 后, 0—1 小时内, B/F 值随时间延长略见升高,但无明显变化,故大批量样品测定时,加入 PEG 液混匀放置 1 小时后方进行离心为宜。

本组将 50 份 T_1 样品及 33 份 HCG 血清样品的 PEG 分离结果与双抗体法进行比较,两种方法的 B/F 值有差别,但用半对数作图,两组标准曲线相平行,斜率相似。用 PEG 法分离的 50 份 T_1 及 33 份 HCG 血

清样品与双抗法相比较。其相关系数分别为 0.925 和 0.916。

与双抗法比较, PEG 法具有方法简便,来源广价格低等优点,故在临床上有一定实用价值。因反应液中丙种球蛋白含量对 B/F 值有影响,故其在标准曲线组与样品组的反应液中含量应力求一致。用放射免疫法测定,尚未建立标准血清的某些物质,加进 PEG 前,可在标准曲线组加入适量的人丙种球蛋白或正常人混合血清。因前者不易得到,本实验用后者,一般加 50—100 微升为宜。如样品抗原含量极高,血清需作 10 倍以上稀释者,亦应在加 PEG 前相应加入少量正常人混合血清,补充一定量的丙种球蛋白,以保证抗原-抗体复合物的充分沉淀。

我们还就 T_4 放射免疫测定系统,用上述两种分离法所得结果作一比较,见下表:

项 目	PEG	双抗体法
原料来源	方 便	较复杂
实验周期	较 短	较长(4℃下温育)
非特异性结合	5—10%	<5%
专一性	稍 差	好
与血清中 γ -G 含量关系	有	无
受血清中抗 T_1 、 T_4 内生抗体干扰	有	无

[本文于 1979 年 9 月 26 日收到]

新 期 刊 介 绍

«环境科学学报»(季刊),将于 1981 年 3 月创刊。此刊物,主要刊登环境科学方面具有创造性和我国特色的理论或基础性研究的学术论文、新技术与新方法,

以及综合性的重大成果。中国科学院环境科学委员会主办,科学出版社出版,国内由各地邮局发行,国外由中国国际书店发行。