

是基本相同的,可以根据蛋白质来研究进化,但仅仅蛋白质的演化不一定导致生物的进化,这点是必须说明的。

另外,我认为这样解释生物进化的机制,能够较较好地把握辩证法中的偶然和必然,内因和外因等关系联系起来。

一百多年前达尔文进化论的问世,不仅使人类对于生物界而且对整个自然界的认识大大前进了,而且对自然科学和哲学产生了深远的影响,所以被恩格斯誉为十九世纪三大发现之一。但是人类在一定的历史条件下对物质世界的认识总是有限的,随着科学实践的发展,人们根据新的证据,提出新的学说,向传统理论挑战,显然是科学发展途程中的正常现象。

参 考 文 献

- [1] 刘为民:《生物化学与生物物理进展》,1981年,第5期,P22—27。
- [2] 黄惠慈:《生物化学与生物物理进展》,1981年,第1期,P1—3。
- [3] 木村资生:《科学与哲学》杂志,1979年,第3期,P13—18。
- [4] King, J. Cieral:《科学与哲学》,1979年,第3期19—48页。
- [5] 佐佐木敏裕:《科学与哲学》,1979年,第3期,6—7页。
- [6] 阿伐斯 J. C.:《科学与哲学》,1979年,第3期,74页。

[本文于1982年6月17日收到]

第十二届国际生化大会有关生物膜研究的动态

杨 福 愉

(中国科学院生物物理研究所)

第十二届国际生化大会于1982年8月15日至21日在澳大利亚西部佩思市举行。这次会议共有53个国家与地区的2,000多名生化工作者参加,与三年前在加拿大多伦多市举行的十一届大会(7,000—9,000人参加)的盛况相比较,显得有些冷清。很多人认为,这主要是由于会址距离欧、美两洲太远,旅费过于昂贵,因而导致出席人数剧减。

这次会议共有四种交流形式:(1)大会综述报告,(2)科学论文板报,(3)专题讨论会以及(4)结合板报内容的小型交流讨论会。

大会综述报告共举行三次,美国 P. Leder 作了“小鼠和人的基因排列与重排”的报告,美国 J. R. Knowles 作了“酶的催化在机理上有必然性吗?”此外,还有:日本 S. Numa 的“多-激素前体和它们的基因”;澳大利亚 M. P. Hatch 的“光合的碳同化途径:生物化学的多样性和植物的功绩”;日本 K. Yagi 的“黄素蛋白催化:基础与生物医学方面”;瑞士 C. Weissmann 的“克隆干扰素 α 基因在原核和真核细胞中的表达”。

大会按13个研究领域组织专题讨论、科学论文板报展出以及小型交流讨论会,它们是:(1)基因组,(2)蛋白质合成与转录后的控制,(3)生长与分化,(4)免疫生化,(5)代谢与调节,(6)激素,(7)植物生化,(8)膜,(9)生物能力学,(10)酶作用机理调节,(11)结构蛋白和结合蛋白,(包括收缩蛋白)的结构和功能,(12)神经化学,(13)生物工程学。

从这次大会的学术交流内容来看,以分子遗传学(包括遗传工程)最为活跃,但生物膜仍然是一个引人注目,十分活跃的研究领域,与三年前十一届国际生化大会相比较,有些方面也取得了明显的进展。下面仅就作者参加较多的、有关生物膜的结构、能量转换以及膜蛋白的跨膜运送等方面扼要地作些介绍。

一、生物膜的结构

在生物膜研究领域,这次大会组织了两次“生物膜结构”的专题讨论会,报告的题目有(1)生物膜中脂分子的组织化(Organization)和脂-蛋白质的相互作用,(2)生物膜中脂-蛋白质的

相互作用和可溶性脂蛋白, (3)生物膜中蛋白质-蛋白质的相互作用, (4)膜脂的不对称分布和交换, (5)膜的重建, (6)生物膜的有序性和动态性。由此可以看出,在膜结构的研究中脂-蛋白质的相互作用是一个注意力比较集中的问题。美国弗莱士 (Fleischer) 教授在他的“膜的重建”的报告中介绍了通过重建来研究膜脂-蛋白质相互作用的情况,引起了到会代表的兴趣。弗莱士实验室分别从牛心线粒体膜和肌细胞肌质网膜中分离提纯 β -羟丁酸脱氢酶 (BDH) 和钙泵蛋白 (CPP 即 Ca^{2+} -ATP 酶)。这两个酶都需脂的存在才能呈现活性。当酶蛋白去脂后活性丢失,当它们在人工脂微囊(脂质体)重建后活性重现。BDH 对脂的需求具有很强的专一性,必须加入磷脂酰胆碱 (PC) 酶活才能恢复,而 CPP 对脂需求的专一性就较差。弗莱士教授通过这二种膜酶在脂质体上的重建来研究膜脂-蛋白质的相互作用。这二种膜酶的活性都受脂质体中脂分子物理状态(流动性)的影响。另一方面,膜酶嵌入脂质体后脂分子的流动性也受到一定的影响,如 BDH 嵌入脂质体后会降低脂分子极性部位的流动性。

荷兰 Van Deenen 教授的报告——“膜脂的不对称分布和交换”中介绍了以红细胞膜为材料,研究膜脂不对称性对表现红细胞正常形态与功能的重要性。它们从牛肝中分离一种磷脂酰胆碱交换蛋白 (PCEP),它能在温和的条件下使红细胞膜的磷脂胆碱被其它的磷脂换置下来以研究某种膜脂组分对生物膜结构与功能的重要性以及它们分布的不对称性。

在膜的结构研究方面,生物膜的流动性在这次会议上仍然是一个令人注意的问题。不仅用多种物理手段(如核磁、顺磁、荧光等)在理论上进行多方面的研究,而且从膜的流动性与植物的抗冷性,膜的流动性与心肌细胞的正常功能以及毒素(如蜂毒)的毒性与影响膜的流动性的相关性等等方面也都开展了研究。

二、生物膜与能量转换

1. 线粒体内膜电子传递组分的研究 西德

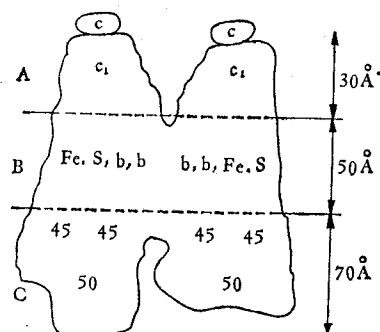


图1 红色面包霉 *Neurospora crassa* 线粒体辅酶 Q: 细胞色素 c 还原酶的跨膜分布示意图

c、c₁、b——红细胞色素 c、c₁ b; Fe·S——铁硫蛋白; 45、50——分子量为 45、50 千道尔顿的亚单位
A. 内外膜间隔 B. 脂双分子层 C. 线粒体基质

H. weiss 介绍了他的实验室对红色面包霉 (*Neurospora crassa*) 线粒体辅酶 Q: 细胞色素 c 还原酶(复合体 III) 结构的研究结果。这个复合体的分子量约为 550,000, 以双体形式存在,每一单体内含细胞色素 6, c₁, FeS 以及其它三个可能不含辅基的亚单位。Weiss 等运用生化分离,小角度中子散射以及电镜等技术对该复合体的结构进行了综合研究,并提出了三维结构的假设模型(见图 1)。从图中可见整个酶复合体系跨膜分布,其中约 30% 嵌入脂双分子层,70% 位于膜的两侧。

2. 能量转换机理 三年前在加拿大多伦多市召开的第十一届国际生化大会时,化学渗透假说的创始人英国 Mitchell 教授亲自参加了会议并作了报告。当时一方面有大量实验结果支持化学渗透假说,但另一方面也有一些实验室提出与 Mitchell 假说中关于质子电化学梯度形成的机理有矛盾的结果。例如, Mitchell 认为,线粒体内膜上的呼吸链构成三个回路,通过电子与氢交替传递,使 H^+ 发生定向移位因而形成膜内、外质子电化学梯度。但有些实验室的研究结果表明,一些膜上的酶或酶系的本身就是质子泵,因而并不支持 Mitchell 的“回路”的说法。例如,线粒体内膜呼吸链的末端氧化酶(细胞色素氧化酶)按 Mitchell 观点,它仅仅是一个电子传递体,并不具有质子泵的作用。但芬兰年轻的科研工作者 Wikström 等通过很多

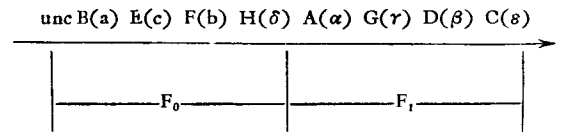
实验说明, 细胞色素氧化酶本身即具有质子泵的作用。1979 年以来很多实验室的结果进一步支持 Wikström 的观点。Mitchell 没有参加这届大会, Wikström 在专题讨论会上的发言中提到, 目前除了 Mitchell 和意大利 Papa 实验室以外都已同意细胞色素氧化酶具有质子泵的观点。

3. H^+ -ATP 酶复合体的研究 广泛存在于线粒体内膜、叶绿体类囊体膜、细菌质膜的 H^+ -ATP 酶复合体是生物膜能量转换的关键组分。其结构与功能的研究在这届大会中仍然是引人注目的一个活跃课题。ATP 酶复合体主要由催化活性中心 (F_1) 和质子通道 (F_0) 所组成。 F_1 内含 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 五种亚单位。在细菌细胞质膜中 F_0 内含 2—3 种亚单位。日本 Kagawa 由于利用耐热细菌 PS3 作实验材料获得了很有特色的结果。近三年来他在 H^+ -ATP 酶复合体的拆离与重建方面又做了不少工作, 继续处于领先地位。他们认为耐热菌 PS3 H^+ -ATP 酶复合体的 F_1 的五种亚基中, α 、 β 、 γ 的作用在于表现酶活力, δ 、 ϵ 两种亚基在于使 F_1 与 F_0 相联结。Kagawa 等将耐热菌 PS3 的 F_1 (TF_1) 的亚基 T_α 、 T_β 、 T_γ 与大肠杆菌 *E. coli* 的 F_1 (EF_1) 的 E_α 、 E_β 、 E_γ 进行杂交, 然后测定其活性和耐热性。实验结果表明, $E_\alpha T_\beta E_\gamma$, $E_\alpha E_\beta T_\gamma$, $T_\alpha T_\beta E_\gamma$ 的比活基本相似。 $T_\alpha T_\beta E_\gamma$ 的性质与 TF_1 基本相似, $E_\alpha E_\beta T_\gamma$ 的性质与 EF_1 基本相似。耐热菌 PS3 的 H^+ -ATP 酶具有耐热性, 但如果 $T_\alpha T_\beta T_\gamma$ 其中一个亚单位被取代就不能保持对热稳定的特性。

Kagawa 实验室还与遗传学家、生物物理学家进行广泛协作, 运用圆二色性, 小角度 X 光散射等物理手段和分子遗传的实验技术对 H^+ -ATP 酶复合体的构象和各组分的一级结构进行研究获得很有特色的成果。

从分子遗传学来研究 H^+ -ATP 酶的结构与功能能给人留下了较深的印象。澳大利亚 Gibson 用大肠杆菌 *E. coli* 为实验材料, 多年来筛选出很多 H^+ -ATP 酶有缺陷的变种-氧化磷酸化解偶联变种 (unc)。通过生化分析以及

遗传工程等技术和方法他们发现, 编码 *E. coli* H^+ -ATP 酶的基因都位于同一操纵子上, 这些基因的核苷酸序列都已分析完成, 它们编码 H^+ -ATP 酶复合体的那个亚单位也已搞清楚:



其中 B. E. F. H. A. G. D. C 为基因代号, a. c. b 系 H^+ -ATP 酶复合体 F_0 的组分, δ 、 α 、 γ 、 β 、 ϵ 则为 F_1 的亚单位。在此基础上, Gibson 等推知了 F_0 的一级结构, 并发现有些部位的氨基酸被置换后会影响 H^+ -ATP 酶功能, 导致氧化磷酸化解偶联。此外, 他们还利用遗传工程和单克隆技术对 H^+ -ATP 酶复合体的生物合成进行研究, 提出在装配过程中各亚单位的结合顺序: F_1 的 α 和 β 亚单位的组装先于 F_0 中 H^+ 通道的形成。

日本 Futai 等也用大肠杆菌 *E. coli* 作实验材料, 他们分离出 43 个变种, 利用遗传工程和单克隆技术已推知 *E. coli* 的 H^+ -ATP 酶复合体的 F_0 和 F_1 的组分的氨基酸序列。看来这个实验室与澳大利亚的 Gibson 实验室正在进行剧烈的竞争。

三、蛋白质运送通过膜

在生物膜与物质运送方面, 西德 Klingenberg 等在线粒体内膜 ADP/ATP 运送载体的研究方面继续有新的进展。他们已将该载体蛋白的氨基酸序列 (297 氨基酸残基) 分析清楚。分子量为 32,900。通过圆二色性, 顺磁共振等仪器的测试研究了 ADP/ATP 载体往返运送过程中在线粒体内膜两侧构象的差异。

这届大会中在生物膜与物质运送方面研究更引人注目的还是蛋白质运送通过膜的问题。目前侧重于 (1) 蛋白质通过膜的“信号假说, Signal hypothesis”和 (2) 合成的蛋白质如何通过线粒体膜等两方面。

1 蛋白质通过膜的“信号假说” 这一假说是 70 年代初提出的。它认为, 象分泌蛋白一类

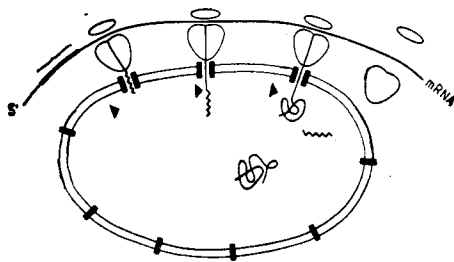


图2 “信号假说”示意图
[TIBS 1, No. 9, 320, 1982]

~ 信号序列 ■ 受体 ▶ 信号多肽水解酶
~ 信号序列密码

合成后需通过膜的蛋白质的“翻译”过程，开始是在“自由”核糖体上进行的，编码蛋白质合成的结构基因还含有一种“信号序列”(Signal Sequences)，通过“翻译”形成“信号多肽”。它与粗型的内质网膜的“识别序列”相结合从而使正在合成的多肽能穿越膜。“信号多肽”一旦穿越膜即被多肽酶水解，而蛋白质合成仍继续进行。这一假说认为，膜蛋白质合成的“翻译”过程与它们穿越膜的过程是同时进行的(图2)。近年来美国的 Blobel 与西德 Meyer 等的工作对“信号假说”又有新的发展，他们认为，在粗型内质网膜表面还有一种“信号识别蛋白”(Signal recognition protein, SRP)，它们释放到细胞质后能识别正在合成的分泌蛋白(或穿越膜的其它蛋白质)的核糖体。当 SRP 与这些含有“信号多肽”的核糖体结合后，多肽合成暂时停止。与此同时将它们引向粗型内质网与膜上 SRP 的受体(或称‘jocking protein’‘停留’蛋白)相结合(图3)，之后多肽合成又恢复进行。这些研究结果表明，分泌蛋白、插入或穿越膜的蛋白质的合成过程是很复杂的。”信号多肽”的作用在于使正在合成的蛋白质能识别并穿越膜。而 SRP 的作用则在于识别正在合成分泌蛋白或其它插入，穿越膜的蛋白质的核糖体，并将它们(而不是合成其它蛋白质的核糖体)引向内质网膜与之结合，然后蛋白质合成过程继续进行。

2 合成的蛋白质如何通过线粒体膜 线粒体也含有 DNA, RNA, 核糖体等, 在遗传上具有一定的自主性。线粒体内含的蛋白质绝大多数系由细胞核的 DNA 提供信息, 并在细胞质

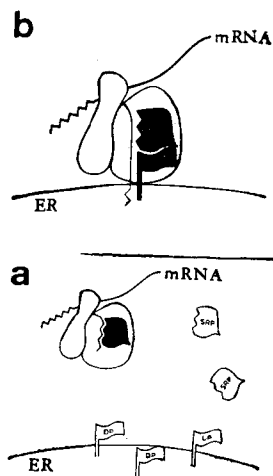


图3 “信号识别蛋白(SRP)的作用机理

a: SRP 与含有“信号多肽”的核糖体结合, b: SRP 将合成分泌蛋白(或穿越膜的其它蛋白质)的核糖体引向内质网并与其膜上的 SRP 受体相结合。ER: 内质网, DP: SRP 受体(或称‘停留’蛋白)
[自 TIBS, 1 No. 9, 321, 1982.]

中的核糖体内合成, 合成以后再通过线粒体膜运至内部进行更新或组装。研究这些蛋白质如何通过线粒体膜进行运送, 不仅对线粒体的生物发生而且对了解细胞质内蛋白质如何通过其它膜系也很重要。瑞士 Schatz 和西德的 Neupert 等研究的结果说明, 除线粒体外膜外, 细胞质内合成的蛋白质插入内膜(如, H^+ -ATP 酶复合体或细胞色素氧化酶的一些亚单位, D- β -羟丁酸脱氢酶等)或通过内膜进入基质(如, L-谷氨酸脱氢酶, 苹果酸脱氢酶, 鸟氨酸氨甲酰转移酶)或进入内、外膜的间隔(如, 亚硫酸氧化酶)的过程, 都具如下特点。a. 通过线粒体内膜的多肽或蛋白质起始都是先合成较大的前体, 通过膜时进行酶促水解形成“成熟”的形式, 进入内、外膜的间隔的蛋白质在通过内膜后需进行两步酶促水解反应。与‘信号假说’中正在合成的蛋白质通过内质网膜的情况不同, 新生多肽或蛋白质通过线粒体膜时合成过程已经停止。它们通过膜的过程并不伴随蛋白质合成的‘翻译’过程。b. 蛋白质通过线粒体内膜是需能的过程。c. 蛋白质通过线粒体内膜时看来膜上都有相应的受体与之结合。

(下转第 68 页)

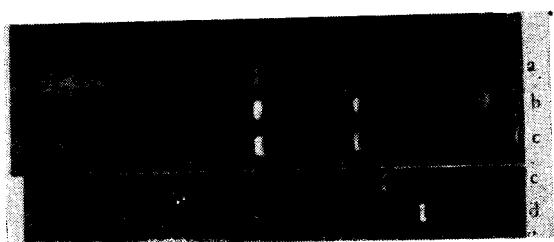


图2 琼脂糖凝胶电泳检查纯化的 pBR322
1% agarose 凝胶板

缓冲液: 50mM Tris-HCl (pH7.8) 20mM NaAc,
20mM NaCl, 电泳条件: 50V, 15hr.

- a: 经溶菌酶-SDS-NaOH 裂解得到的核酸粗提液。
b: 经 Sepharose 2B 柱层析后 pBR322 样品。
c: 经酚萃取一次后而得到的 pBR322 样品。
d: 经 EcoRI 酶解后的 pBR322。

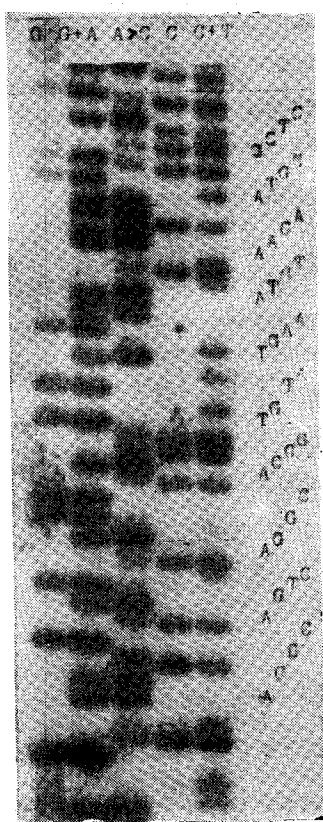


图3 用本方法制备的 pBR322 的 Hind
II-Hpa II 片段中部分 DNA 碱基序列

图示出从第 67 个碱基起至 106 个碱基共 40 个碱基的序列。
ACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAAT
GCGCTC

用本方法制备的 pBR322 已成功地用作构建 pCaMV C17 重组质粒的载体(待发表)。所做的抗药因子转化大肠杆菌实验表明, 用钙离子处理的 *E. coli* 802 为受体, 每微克 pBR322 和 pFMDV 1034 DNA 能产生 10^5 以上的转化株, 均有较高的转化效率。

用本方法制备的各种质粒经多种限制性内切酶作用, 酶切图谱正常, 没有其它 DNA 的干扰。用于 DNA 序列分析时, 质粒经酶切后产生的 DNA 片段可以被多核苷酸激酶和 γ - 32 P-ATP 高比度地被标记, 说明无小分子 RNA 杂质干扰。pBR322 的部分片段的序列分析结果(图 3) 还表明质粒 DNA 制备过程中的各步骤对 DNA 碱基序列无影响。

以上结果表明, Sepharose 2B 柱层析分离大肠杆菌质粒 DNA 方法, 可用于大量制备中除去细胞 RNA 和染色体 DNA 的污染, 以获得纯的质粒 DNA, 以便用于 DNA 分子重组和 DNA 序列分析等研究。

参 考 文 献

- [1] Radloff, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **57**, 1514, 1967.
- [2] Kahn, M. et al.: *Methods in Enzymol.*, **68**, 268, 1979.
- [3] Cornelis, P. et al.: *Plasmid*, **5** (2), 221, 1981.
- [4] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **91**, 303, 1978.
- [5] 敖世洲等《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 第 12 卷 3 期, 第 243 页.
- [6] Best, A. N. et al.: *Anal. Chem.*, **11**, 235, 1981.
- [7] Birnboim, H. C. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, **7**, 1513, 1979.
- [8] Zasloff, M. et al.: *Nucl Acid Res.*, **5**, 1139, 1978.
- [9] Kupper, H. et al.: *Nature*, **289**, 555, 1981.
- [10] Cohen, S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2110, 1972.
- [11] Maxam-Gilbert: *Methods in Enzymol.*, **65**, 499, 1980.
- [12] 方荣祥:《微生物学通报》(1982 年, 9 期, 224 页).

[本文于 1982 年 7 月 28 日收到]

(上接第 19 页)

生物膜的研究范围很广。从本届国际生化大会生物膜的专题讨论和科学论文板报仅能看到生物膜研究的一些动向, 在会上很多学术交

流活动是同时进行的, 作者只能选择自己最感兴趣的参加, 上述介绍免不了带有一定的局限性, 仅供读者参考。

[本文于 1982 年 11 月收到]