

而向氢氧化钠和盐酸溶液滴入蒸馏水没有发光产生。Владимиров 等曾证明,许多化学反应都具有蓝绿光谱和紫外光区范围内的超弱发光^[7]。

生物体内最易氧化、数量最多的是碳水化合物,且脂类、蛋白质和碳水化合物之间有代谢循环的关系,氧化的最终产物是 H_2O 和 CO_2 。氧化形成 H_2O 时是否有发光产生,上述的放热发光效应在体内发光占有何种位置,发光是否为代谢程度的综合反应,这些问题均有待研究。

此工作在内蒙古农牧学院进行,由耿庆汉副教授指导,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Colli, L. et al.: *Experiment.*, 11/12, 479—481,

1955.

- [2] Тарусов Б. Н., и др.: *Сверхслабое свечение биологических систем. Изд Моск. Унив.*, 1967.
- [3] Тарусов Б.Н. и др.: *Труды. моип.*, **36**, м. 1972.
- [4] Агавердиев А. Ш., и др.: *Докл. А. Н. СССР.*, **163**, № 4, 1965.
- [5] Гасанов Р. А., и др.: *Научн. докл. высш. биол. науки.*, № 3, 1963.
- [6] Китлаев Б. Н., и др.: *Труды. МОИП.*, **36**, М, 193. 1972.
- [7] Владимиров Ю.А., и др.: *АН. СССР. изд. «наука»*, м, 1966.
- [8] Гэн Чин-хань: «Изменчивость кукурузы в зависимости от степени зрелости семян, предпосевного охлаждения и сроков посева», Харьков., 1959.
- [9] 李庆国等: «生物化学与生物物理进展», 1, 66, 1981.
- [10] 严智强等: «生物化学与生物物理进展», 2, 1979.

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]

猪心线粒体 F_1 -ATP 酶的水解活性与色、酪氨酸残基相关的构象的关系*

林治焕 李生广 孙 珊 许桂珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

线粒体 H^+ -ATP 酶具有双向功能,即 ATP 的合成与 ATP 的水解。 H^+ -ATP 酶的头部 F_1 具有催化这二种功能的活性部位, F_1 的活性表现位与它结合核苷酸的类型、数目以及亲和力有关^[1]。至于 F_1 分子活性部位中什么结构与这两种功能有关,目前尚不肯定。自 1960 年以来关于线粒体 F_1 的水解功能与其结构中氨基酸残基关系的研究,多采用特异的化学试剂去修饰某些氨基酸残基,然后测其水解活力被抑制的情况。Senior^[2] 认为不是含—SH 基的半胱氨酸而是酪氨酸残基,还可能包括色氨酸残基与 ATP 的水解有关。也有报道认为是与组氨酸、谷氨酸或精氨酸残基有关^[3]。现在蛋白质结构与功能的研究已深入到研究蛋白质在溶液中执行生理功能时与其构象的关系。很多研究指出,

线粒体 F_1 在溶液中与核苷酸或 Mg^{++} 作用后构象发生了改变。70 年代前后不少人以金轮霉素作为构象的荧光探针,去探测 H^+ -ATP 酶复合体,或 F_1 分子与各种配基结合后构象的改变^[3]。我们的工作是利用四种有机溶剂以及一些 F_1 水解作用的抑制剂研究 F_1 水解作用与构象的关系。

猪心线粒体 F_1 在不同的激发波长作用下,其内源荧光光谱能显示其结构中酪氨酸与色氨酸的荧光峰。与水混溶的有机溶剂如甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺 (DMF) 和二甲基亚砜 (DMS) 等,由于它们能够引起 F_1 分子构象改变,从而影响其内源荧光,并且因为这些溶剂又是 F_1 水

* 本文主要内容曾在 1981 年 11 月第四次中国生物化学学术会议宣读。

解作用的激活剂或抑制剂,因此我们用它们测其对 F_1 水解活力的影响,并且观察其对 F_1 内源荧光的影响。另一方面,我们也用几种 F_1 的抑制剂如金轮霉素、叠氮化钠、溴代乙酸钠、以及 Ellman's 试剂等测定其对 F_1 水解作用的抑制及对 F_1 内源荧光的影响。

一、材料与方 法

1. 猪心 F_1 -ATP 酶的制备与测活 按本实验室的方法^[4],制备所得 F_1 比活力为 80—90 $\mu\text{moles ATP 水解/分/mg 蛋白}$ 。

2. 溴代乙酸钠 由化学所胡粹青同志赠给。

3. 猪心 F_1 内源荧光光谱的测定 因为 F_1 是在 52.5% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中沉淀,又在介质为 50mM Tris- SO_4 、1mM EDTA、2mM ATP、pH7.4 中保存,所以用前必须离心得到 F_1 沉淀,将 F_1 沉淀重溶于 40 mM Tris- SO_4 、1mM EDTA、pH8.0 中。测定时蛋白浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 。用 Hitachi 650-60 荧光分光光度计测定,每条荧光曲线都采用减去背景荧光的方法。

4. 测定有机溶剂和抑制剂等对 F_1 的水解活力及内源荧光的影响 在上述测定系统中加入有机溶剂或抑制剂等以后,30℃ 保温 20 分钟进行测定。

5. 所有测荧光用试剂预先都测定了它们在 200—700nm 的吸收光谱。

二、结果与讨论

1. 四种有机溶剂(甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺和二甲基亚砷)对 F_1 -ATP 酶活力的影响。

从图 1 看 5—20% 浓度的甲醇都有激活作用,当浓度为 15% 时激活作用最大。关于甲醇对 F_1 -ATP 酶活力的影响, E. stutheimer 提出按 Rachtenwald & Hess^[5] 建议的模型解释,即低浓度甲醇时加强了酵母 F_1 调节部位对 ATP 的亲合力,高浓度时阻止了 F_1 调节部位与催化部位的作用,但他没有指出甲醇浓度高低的范围。我们的实验结果是当甲醇浓度达 20% 时激活程度开始下降。乙醇的浓度低于 10% 未

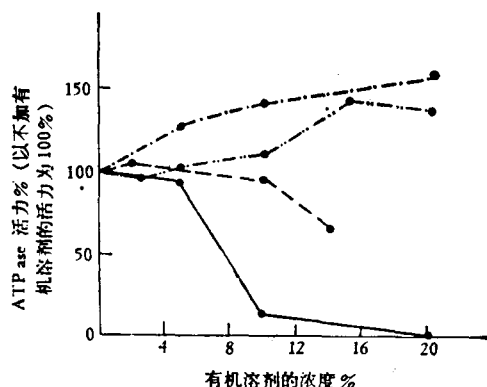


图 1 不同的有机溶剂对 F_1 -ATPase 活力的影响
---: 甲醇; -.-: DMS; ---: 乙醇; —: DMF

见明显的激活或抑制,浓度大于 10% 时活力明显被抑制。这与 Kagawa^[7] 所报道的牛心 F_1 结果相似。DMF 达 5% 以上即有急剧的抑制作用,DMS 则不同,浓度在 20% 以内全部是激活作用。引人注意的是 DMF 与 DMS 在结构上只有甲酰胺与亚砷两部分不同,但它们的作用却是相反的。文献曾报道^[5] HSO_3^- 与 SO_3^{2-} 对酵母 F_1 -ATP 酶起相反作用,但 DMF 与 DMS 对 F_1 的作用机理可能与 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 不同。

2. 四种有机溶剂对 F_1 内源荧光的影响 在测定活力变化的同时,还观察以上四种溶剂对 F_1 内源荧光的影响,以便研究二者间的关系。

蛋白质在 260—300nm 波长的光吸收主要取决于分子中的色氨酸与酪氨酸。色氨酸的激发光谱在 210—300nm,酪氨酸的激发光谱在 210—290nm,并且所有氨基酸中色氨酸的天然荧光最强。图 2 为 F_1 的内源荧光光谱。由于我们采用了减去背景荧光的方法,所得结果较文献[8]报道的正确。从图 2 可以看到当激发波长从 260—280nm 变动时,酪氨酸荧光峰逐渐变大,285nm 时开始变小,但色氨酸的荧光却没有出现,只有当激发波长为 290nm 时,色氨酸荧光开始出现,但是仍远低于酪氨酸。当激发波长为 295,300nm 时,酪氨酸已不能吸收此能量,只有色氨酸还能吸收,但它的荧光仍很弱。大多数蛋白质其分子表面如同时有色氨酸又有酪氨酸,色氨酸的荧光可掩盖酪氨酸的荧光。因此从观察到的 F_1 的内源荧光光谱,表明 F_1 分子

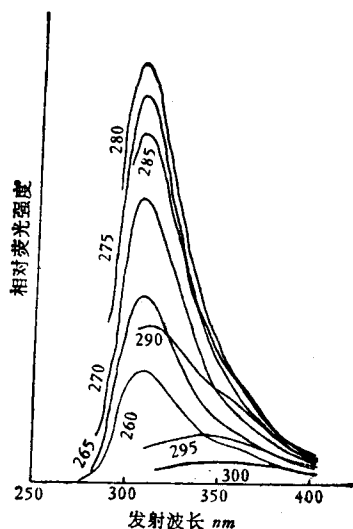


图2 F_1 的内源荧光光谱(激发波长标在图中)

中酪氨酸相当一部分暴露于分子表面,而色氨酸却隐藏于 F_1 的疏水区。我们的另外实验表明 F_1 分子中色氨酸的含量大约只是酪氨酸的 10% [6]。

我们选 275nm 的激发波长检测酪氨酸峰 (306—308nm) 的强度变化。选激发波长 300nm 检测色氨酸峰 (345—350nm) 的强度变化,图 3, 4 表明甲醇对 F_1 的作用是增强了色氨酸的荧光,其增强程度随甲醇浓度的增加而加大,对酪氨酸荧光的作用与此相同。乙醇对 F_1 内源色氨酸荧光也有很显著的增强作用,而且这种作用与乙醇浓度成正比。对酪氨酸荧光的作用趋势相同,但其增大的程度较小。DMF 对 F_1 内

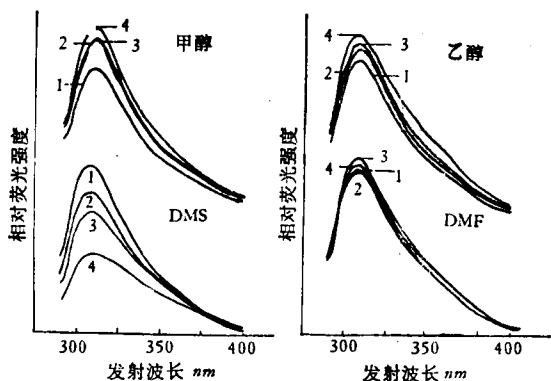


图3 不同有机溶剂对 F_1 内源荧光的影响 (激发波长 275nm)

1: F_1 ; 2: 5% 有机溶剂 + F_1 ; 3: 10% 有机溶剂 + F_1 ; 4: 20% 有机溶剂 + F_1

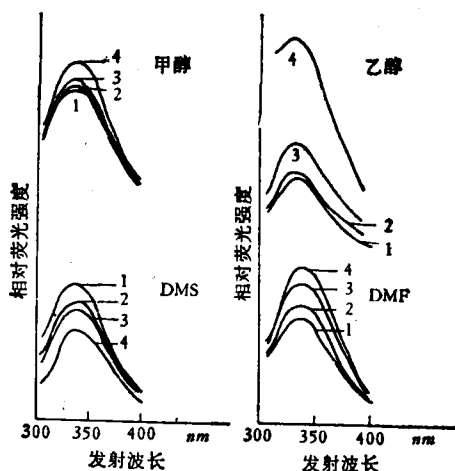


图4 不同有机溶剂对 F_1 内源荧光的影响 (激发波长为 300nm)

1: F_1 ; 2: 5% 有机溶剂 + F_1 ; 3: 10% 有机溶剂 + F_1 ; 4: 20% 有机溶剂 + F_1

源色氨酸的增强也很显著,也随 DMF 浓度的增加而加强。但对酪氨酸的荧光影响很小。DMS 对 F_1 内源荧光的影响比较复杂,因为它在紫外波长 275—340nm 范围内有吸收,因此把 F_1 的激发波长选在此波段范围内,所产生的内源色氨酸与酪氨酸荧光强度减弱,不能只简单归结为 DMS 对 F_1 的结构影响造成的。

结合这四种有机溶剂对 F_1 内源荧光的影响与对 F_1 -ATP 酶活力的影响看,无论是激活或抑制都影响了 F_1 内源的色氨酸与酪氨酸荧光。但就抑制作用说, F_1 构象变化似乎与色氨酸的关系更为密切。例如 20% 浓度的乙醇对 F_1 -ATP 酶有很强的抑制作用,并且大大增强了色氨酸的荧光峰。DMF 对 F_1 -ATP 酶抑制明显,对 F_1 内源色氨酸的荧光影响也很显著。而这两者对酪氨酸荧光的影响都远不及对色氨酸的影响。

这四种有机溶剂都很容易影响 F_1 分子中的氢键、疏水键或离子键,致使 F_1 分子构象发生改变,结果反映在 F_1 内源色氨酸与酪氨酸的荧光变化上。 F_1 内源色、酪氨酸荧光的变化,一方面受 F_1 分子三维结构改变的影响,另一方面也受其侧链周围微环境的变化影响。例如色、酪氨酸的内源荧光可被邻近肽键的羰基淬灭,而这种淬灭又可被 α -螺旋结构的形成解除 [9-10]。

色氨酸也可因三维结构的改变,由原来隐藏于疏水环境而变为从疏水区暴露出来。因此,我们所观察到的色、酪氨酸荧光的强弱变化是以上诸因素影响的总效果。这四种溶剂作用的程度不同,可能是因为它们极性的强弱不同、分子组成结构不同,对 F_1 的构象影响不同所致。

3. 各种抑制剂以及 Ellman's 试剂对 F_1 -ATP 酶的水解作用以及对 F_1 内源荧光的影响。

从图 5 结果看,溴代乙酸钠对 F_1 -ATP 酶有抑制作用。溴代乙酸钠能修饰 F_1 分子中的半胱氨酸与酪氨酸。但在同样条件下, F_1 的水解活力并不受 Ellman's 试剂的影响,此试剂能特异性的修饰含-SH 基的半胱氨酸。因此可推论溴代乙酸钠是作用于酪氨酸。 F_1 的水解作用与酪氨酸有关,这结果与 Senior^[2] 是一致的。金轮霉素与叠氮都是氧化磷酸化抑制剂,也能抑制 F_1 -ATP 酶活力。叠氮的作用很强,在 2.5mM 浓度下已呈现最大的抑制。金轮霉素因药品有限,所得结果是很初步的,在 13.2n moles/mg F_1 蛋白下只抑制水解作用约 20%。

图 6 表明溴代乙酸钠与金轮霉素对酪氨酸荧光峰都产生了影响,但对色氨酸峰无明显作用。而叠氮化钠对酪氨酸荧光峰影响很小,但使色氨酸荧光峰发生了较大的强度变化并有峰位的红移。对照它们对水解活力抑制情况看,溴代乙酸钠与金轮霉素分别只抑制 F_1 的水解活力 20% 左右,而叠氮抑制能力达 80%。一般说

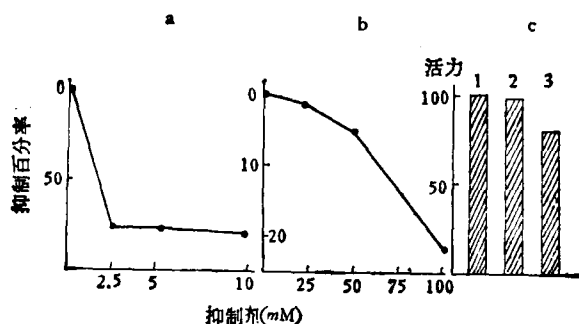


图 5 叠氮化钠(a)、溴代乙酸钠(b)对 F_1 -ATPase 的抑制作用及 Ellman's 和金霉素对 F_1 -ATPase 的作用(c)

图 c 中的 1 表示 F_1 , 2 表示 F_1 + Ellman's 试剂(0.1mM) 3 表示 F_1 + 金轮霉素 (13.2n moles/mg F_1)

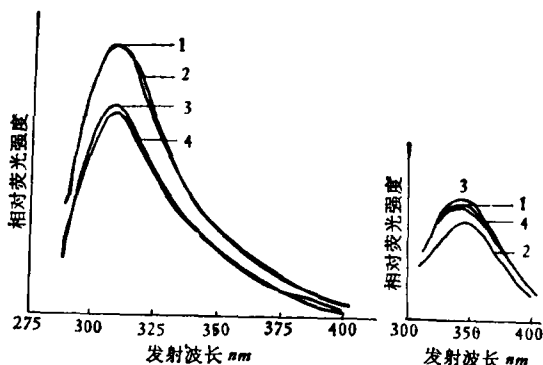


图 6 金轮霉素、溴代乙酸钠、叠氮化钠对 F_1 内源荧光的影响 (左图激发波长 275nm, 右图 300nm)

1: F_1 ; 2: F_1 + 叠氮化钠 (2.5mM); 3: F_1 + 金轮霉素 (13.2n moles/mg F_1); 4: F_1 + 溴代乙酸钠 (100mM)

抑制剂的作用或是修饰某些氨基酸,或是作为配基与 F_1 结合,这都会导致 F_1 的构象变化。从我们所用抑制剂的结果看,它们在影响 F_1 -ATP 酶水解活力的同时,也使 F_1 的内源酪氨酸和色氨酸的荧光强度发生变化,表明 F_1 分子发生了构象变化。当 F_1 -ATP 酶受到较大抑制时,构象变化与色氨酸的关系更为密切,这与上述有机溶剂的结果相类似,意味着此种构象变化已涉及到 F_1 分子的疏水区。刘树森等^[11]曾报道过大鼠肝线粒体内膜 ATP 酶分子疏水结构的存在对于表现酶水解活力是必要的条件。我们的实验结果表明即使在疏水结构存在下,可测的与色氨酸相关的疏水区的扩大,也会对 F_1 -ATP 酶的水解活力产生较大的或完全抑制。

参 考 文 献

- [1] Pedersen, P. L. et al.: in *Energy Conservation in Biological Membrane*, by G. Schäfer and M. Klingenberg, p 159. 1978.
- [2] Senior, A. E.: *Biochemistry*, 12, 3622, 1973.
- [3] Linnett, P. E. et al.: *Method in Enzymology* Vol LV(59), 472, 1979.
- [4] 林治煥等:《生物化学与生物物理进展》, 5, 53, 1981.
- [5] Rackenwald, D. et al.: *FEBS Letters*, 76, 25, 1977.
- [6] 林治煥等:《中国科学技术大学研究生院学报》, 待发表。
- [7] Kagawa, Y.: in *Energy Conservation in Biological Membrane*, By. G. Schäfer and M. Klingenberg, p. 195, 1978.
- [8] Keira, T. et al.: *Experientia*, 34/12, 1548, 1978.
- [9] Cowgill, R. W.: *Biochimica et Biophysica Acta*,

小鼠再生肝、Hca 腹水型肝癌与正常肝 组织核内非组蛋白的电泳比较研究

张宗玉 曹西南 姜春霞*
王武康** 李晓莉 张迺衡

(北京医学院生化教研室)

核内非组蛋白蛋白质(简称 NHP)是一类极不均一的蛋白质,代谢上不稳定,转换率较快^[1]。有人认为 NHP 与基因表达的调控有关^[2],而癌变过程可能是基因表达的调控失常所致,因此当正常细胞转化为癌细胞时,NHP 会发生改变^[3]。据文献报道,某些分化旺盛的组织,其 NHP 亦会发生变化,那么,癌变过程中 NHP 的变化是否与组织增殖者相同。换言之,癌细胞中 NHP 的变化是特异的,还是非特异的,似有研究的必要。本文以小鼠 Hca 腹水型肝癌为模型,小鼠正常肝为本底,小鼠再生肝为对照,用十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳——等电聚焦双向电泳为手段,观察比较了三组 NHP 的异同。同时还作了三组 NHP 的氨基酸组成分析。现将所得结果作一简要报道。

一、材料与 方法

1. 动物模型 (1) 小鼠 Hca 腹水型肝癌 取体重 22 克左右的瑞士种雄性小鼠,无菌操作,腹内注射事先用生理盐水 1:1 稀释的小鼠 Hca 腹水型肝癌腹水液 0.2 毫升,一周后即形成 Hca 腹水型肝癌,禁食 16 小时后杀鼠取腹水。每批约 15 只,共四批。

(2) 小鼠再生肝^[4,5] 取体重 25—30 克正常雄性瑞士种小鼠,乙醚麻醉行无菌手术,切去肝正中叶及左侧叶,共切去原肝重 65—70%,

结扎、止血、缝合,存活率 20—60%。每批手术 40 只,共 6 批。手术后第四天杀鼠取肝,杀鼠前禁食 16 小时。再生肝约为原肝重的 70%。

(3) 正常小鼠 取体重 22—25 克正常雄性瑞士种小鼠,禁食 16 小时后杀鼠取肝。每批约 15 只,共四批。

2. 试剂 Biolyte pH3—10 (Bio-Red); 考马斯亮蓝 R₂₅₀ (Fluka); 脱氧核糖核酸(DNA) (上海东风试剂厂); 酵母核糖核酸(RNA) (Darmstadt); 牛血清清蛋白 (Mw. 68,000), 脱氧核糖核酸酶 I (DNaseI) (Mw. 31,000), 核糖核酸酶 (RNase) (Mw. 13,700), 糜蛋白酶元 (Mw. 25,700), 胃蛋白酶 (Mw. 35,000), 卵清蛋白 (Mw. 43,000) Serva 产品。

3. 分离细胞核以及酚抽提 NHP 基本按 Teng 氏法^[6]。

4. SDS 聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳^[7,8]

样品的预处理 取酚抽提的 NHP 用高浓度尿素溶液透析,将酚相变成水相后,取出样品溶液 2 毫升加等体积的样品配制液, (0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH6.8)10ml 加 SDS 0.1g, β 巯基乙醇 0.2ml) 混匀。沸水浴中加热 1—2 分钟,冷却后取出此样品混合液置透析袋中对样品配制液透析 16—24 小时,透析后用 Lowry 氏法测定样品混合液中蛋白质的含量。然后与下述

* 核工业部北京九所。 ** 遵义医学院生化教研组。