

## 从 11 届国际生物化学会议看 生物膜研究的某些进展

杨 福 愉

(中国科学院生物物理研究所)

第 11 届国际生物化学会议于 1979 年 7 月 8 日—13 日在加拿大多伦多召开,中国生物化学代表团自 1961 年第 5 届国际生化会议后相隔 18 年又出席了会议,受到了大会主席和与会代表的热烈欢迎。

这是国际生化界一次空前的盛会,参加会议的代表约有 9,000 人。会议内容共分 14 个领域: 1. 基因单位的结构、组织和复制; 2. 基因表达及其调节; 3. 蛋白质的结构与功能; 4. 酶作用的机制和调节; 5. 膜的结构与功能; 6. 生物能力学和物质运转; 7. 生长和分化的生物化学; 8. 免疫的生物化学; 9. 神经化学; 10. 感觉、收缩、运动系统的生物化学; 11. 激素生化和作用的分子机制; 12. 疾病的分子机制; 13. 环境生物化学; 14. 其它。除两次全体大会外,共有 58 个专题报告会,244 位科学家作了报告。大会共收到 3,500 篇论文,分期分批以‘论文布告’(Poster)形式展出。由于很多活动是同时进行的,与会代表只能选择自己最感兴趣的去参加,下面仅就作者参加较多的生物膜研究领域汇报一些概况。

生物膜研究在这次会议中是一个引人注目,十分活跃的领域,在全体大会的五篇学术报告中,生物膜就占了两篇:“膜电位是细胞能量转换的‘通货’(通用货币)”,“线粒体内膜的组装和分子生物学”。以‘论文布告’形式展出的 3,500 篇论文中,生物膜研究占第一位。除膜的结构与功能,生物能力学和物质运转外,生长和分化的生物化学,激素生化和作用的分子机制,

疾病的分子机制,蛋白质的结构与功能,酶作用的机制和调节等等研究领域都有不少生物膜研究的内容。现在准备就生物膜的基本结构、能量转换以及生物合成等三方面的某些进展简述如下:

### 1. 生物膜的基本结构

这一方面的论文数量不很多,有些报道利用电子顺磁共振(EPR)和核磁共振(NMR)继续对膜的流动性进行研究,实验结果进一步表明,由于蛋白质-蛋白质、类脂-蛋白质的相互作用,生物膜的流动性并不是均匀的。应用自旋标记类脂化合物研究类脂的流动性和类脂-蛋白质的相互关系的结果表明,有很多膜蛋白(如酵母线粒体内膜细胞色素氧化酶,牛视杆细胞外段盘状膜的视紫红质等)的周围均有一层不流动类脂层(脂圈)。这些类脂层的组成和分子数目则随膜蛋白的不同而有很大的差异。例如,细胞色素氧化酶类脂/蛋白质比值为  $55 \pm 5$ ,视紫红质则为  $\sim 24$ 。

此外,有的报告认为,生物膜类脂也并不是都呈双分子层,有时可发现类脂分子团以六边形排列的构型,这种结构可能与细胞融合,细胞内吞(endocytosis)、胞吐(exocytosis)时膜的功能状态有关。上述结果都可视为“流体镶嵌模型”的补充和修正。

### 2. 生物膜与能量转换

由于这一研究方向与解决能源问题有密切关系,因而在生物膜研究领域中是一个比较感兴趣的分支。在 11 届国际生物化学会议中这方

面的工作报告数量很多。下面就能量转换机理——化学渗透假说和  $H^+$ -ATP 酶的结构与功能的研究动态作一简介:

(1) 化学渗透假说 现在已经比较清楚,生物能量的转换、储存和利用过程大多都与细胞的膜结构紧密相关(例如,线粒体内膜、叶绿体膜、细菌质膜或光合细菌载色体膜等)。英国 Mitchell 提出的化学渗透假说认为,能量转换、储存是通过跨膜的质子电化学梯度 (Transmembrane electrochemical proton gradient) 的形式来实现的。以线粒体氧化磷酸化为例, Mitchell 认为呼吸链在内膜上构成三个回路,底物通过呼吸链进行氧化是一个电子与氢交替传递的过程,使质子 ( $H^+$ ) 发生定向移位,从膜的一侧运送到另一侧。由于膜对  $H^+$  是不通透的,因而形成了跨膜的质子电化学梯度 [ $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ , 或称质子动力势, proton motive force (p. m. f.)] 它包括跨膜的电位 ( $\Delta\phi$ ) 和膜内外的 pH 差 ( $\Delta pH$ )。换言之,可以将呼吸链看做是一个质子泵,而嵌在膜上的  $H^+$ -ATP 酶则可以利用质子电化学梯度使  $ADP + P_i$  合成 ATP。Mitchell 的化学渗透假说,多年来已为大量实验结果所验证,推动了生物能力学的研究,从而使他获得了 1978 年度的诺贝尔化学奖金。在 11 届国际生化会议上,又有很多实验结果支持 Mitchell 的概念。苏联的 Скулачев 进一步提出,膜内外的质子电化学梯度 ( $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ ) 和 ATP 一样是生物能量交换的‘通货’。迄今为止,已发现生物膜的下列 10 种酶或酶系具有质子泵(或称  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  发生器)的作用: (1) 线粒体膜、叶绿体膜、细菌膜的  $H^+$ -ATP 酶; (2)  $H^+$ -焦磷酸酶; (3) 转氨酶; (4)  $NADH-CoQ$  氧化还原酶; (5)  $CoQH_2$ -细胞色素 c 氧化还原酶; (6) 细胞色素氧化酶; (7) 细菌视紫红质; (8) 细菌叶绿素反应中心, (9)、(10) 叶绿体光系统 I 和 II。Скулачев 还认为质子电化学梯度不一定都转换成 ATP 而可以直接作渗透功,机械功或以热的形式耗散能量。

但是,另一方面在这些会议中,也有很多实验室报道与 Mitchell 假说关于质子电化学梯度形成的机制有矛盾的结果。

例如, (1) 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,而不少实验室的研究结果表明,很多膜上的酶或酶系的本身就是一个质子泵,因而并不支持 Mitchell 的‘回路’假说。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。但在这次会议中,有很多实验室都提供了细胞色素氧化酶是质子泵的实验证据。其中大多数都是通过细胞色素氧化酶在脂质体(一种微囊型的人工膜)进行重组后测定的。有的还发现阻遏  $H^+$ -ATP 酶移位  $H^+$  功能的典型抑制剂——二环己基碳二亚胺 (DCCD) 对细胞色素氧化酶移位  $H^+$  的功能也有抑制作用。(2) 根据 Mitchell 假说,线粒体呼吸链在  $NADH \rightarrow O_2$  的整个过程中每对电子传递结果共释出  $6H^+$ , 但 Lehninger 等实验室应用几种新方法测定的结果表明,每对电子经过三个贮能点时  $H^+/2e$  释出比值接近于 4.0, 因而每对电子从  $NADH \rightarrow O_2$  的传递过程中共释出  $12H^+$ , 比 Mitchell 原先提出的数值大 1 倍。

至于跨膜的质子电化学梯度如何驱动  $H^+$ -ATP 酶使  $ADP$  与  $P_i$  合成 ATP 的机制问题则更远远没有解决。综上所述,虽然跨膜质子电化学梯度 ( $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ ) 是细胞能量转换、储存的一种普遍形式的概念已为大量实验所证实,但转换的具体过程则仍未完全阐明,尚有待进一步研究。

(2)  $H^+$ -ATP 酶的结构与功能 线粒体内膜、叶绿体膜、细菌质膜的  $H^+$ -ATP 酶是生物膜能量转换的关键组成部分,因而对其结构与功能的研究十分活跃,是生物能力学研究领域中‘热点’之一。研究内容主要有以下几方面:

(a)  $H^+$ -ATP 酶各部分的拆离与重组 大量实验结果表明,不同来源的  $H^+$ -ATP 酶既有共性又有差别。牛心线粒体  $H^+$ -ATP 酶是一个分子量约 480,000 的复合物,它由三个部分组成: (i) 可溶性 ATP 酶—— $F_1$  (头部), (ii)

赋予对寡霉素敏感的蛋白 OSCP (柄部) 以及 (iii) 疏水蛋白  $F_0$  (基部)。目前各部分的拆离与重组工作已进行得很深入。最近几年日本香川靖雄 (Kagawa) 对耐热菌 PS3 质膜的  $H^+$ -ATP 酶的拆离、重组工作做得比较出色。根据他的报道,耐热菌的  $F_1$  ( $TF_1$ ) 由 5 种亚单位组成,它们的相对比例为  $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon = 3:3:1:1:1$ 。 $\beta$  亚单位为催化位点, $\gamma, \delta, \epsilon$  复合组成“门”, $\delta, \epsilon$  亚单位组成的复合物具有联结  $TF_0$  与  $TF_1$  的作用(见图 1)。 $TF_1$  的五种亚单位对

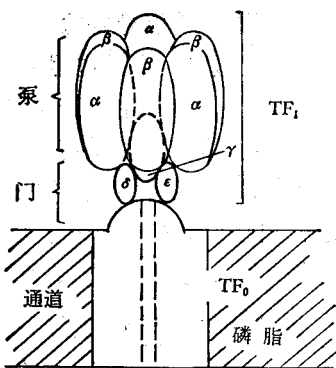


图 1 耐热菌 ATP 酶复合体的结构模式图

ATP 的合成和  $H^+$  的移位都是必需的。与线粒体的  $F_0$  相比,  $TF_0$  较为简单,只含两种亚单位:结合  $TF_1$  的蛋白 (分子量为 15,500 道尔顿) 和结合 DCCD 的蛋白脂质 (Proteolipid), (分子量为 6,500 道尔顿) 两者共同组成  $H^+$  通道 (见图 2)。

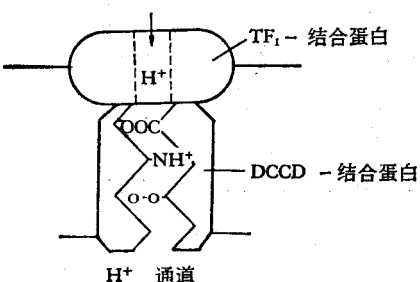


图 2 耐热菌 ATP 酶复合体  $TF_0$  结构模式图

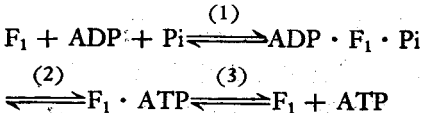
瑞典 Ernster 实验室报道,  $F_0$  和 OSCP 都具有联结  $F_1$  与  $F_0$  的功能,但只有在两者共同存在的条件下,才使 ATP 酶复合体具有对寡霉素和 DCCD 的敏感性。他们还发现,  $F_1$  直接与

$F_0$ 、OSCP 相结合的是  $\delta$  亚单位,但  $F_1$  的其它亚单位及整个  $F_1$  的四级结构都会影响  $F_1$  与  $F_0$  的相互联结。

美 Racker 实验室对线粒体内膜  $H^+$ -ATP 酶的  $F_0$  进行拆离、重组。他们认为,  $F_0$  复合物含有 6 种多肽。它们的分子量分别为: 28,000, 22,000, 9,500, 7,800 (结合 DCCD 的蛋白脂质), 7,300, 6,800 道尔顿。Racker 等发现, 分子量为 28,000 道尔顿的多肽是表现  $^{32}P$ -ATP 交换活力的主要组份。他们认为,线粒体内膜  $H^+$ -ATP 酶的下列几种亚单位,是表现酶活性的必需组份:  $F_1$  (5 种亚单位), OSCP,  $F_0$ , 结合 DCCD 的蛋白脂质以及 28,000 道尔顿亚单位。

西德 Sebald 实验室对耐热菌 PS3 的 ATP 酶的  $TF_0$  中与 DCCD 相结合的蛋白脂质的氨基酸的序列进行分析,并从进化观点与线粒体内膜;菠菜叶绿体膜以及大肠杆菌 E.coli 质膜的  $H^+$ -ATP 酶的  $F_0$  的相应组份进行比较,结果发现含有 72 个氨基酸序列中只有 6 个位置的氨基酸组份是共同的。

(b)  $H^+$ -ATP 酶中结合的 ATP 和 ADP 的作用 70 年代以来 Slater, Boyer 等实验室发现,分离的  $H^+$ -ATP 酶的  $F_1$  组份中含有紧密结合的 ATP 和 ADP (2—3mol/mol ATP 酶)。他们原先认为这些腺嘌呤核苷酸可能参与偶联磷酸化过程,因而提出如下的假设: 线粒体电子传递所释放的能量首先转换为质子电化学梯度,然后这种形式储存的能量使  $F_1$  结合的 ADP 与  $P_i$  合成 ATP 并使合成的 ATP 从紧密结合状态解离下来,他们认为能量主要系用于后一步骤。这些过程可用下式简单表示:



近年来,一些实验结果表明,分离的  $F_1$  中结合 ATP 或 ADP 的位点至少有 7 个,其中 2 个系与催化位点—— $\beta$  亚单位相结合。各个位点与 ADP 或 ATP 相结合的紧密程度并不相同。与催化位点—— $\beta$  亚单位相结合的程度是较弱的。瑞典 Baltsheffsky 及其它实验室报道,

$F_1$  中紧密结合的 ATP 或 ADP 并不参与  $H^+$ -ATP 酶催化 ATP 的合成或水解过程。其余结合的 ATP 或 ADP 究竟起些什么作用？迄今还不清楚。因此  $H^+$ -ATP 酶将电子传递所释放的能量合成 ATP 过程中主要是用于上述(2)还是(3)反应仍然还没有解决。

### 3. 膜的生物合成

相对讲，膜的生物合成在生物膜研究中是一个比较年轻的领域，但近年来这方面也有显著进展因而引起与会者的很大兴趣。

蛋白质的合成系在细胞质内核糖体上进行的。很多蛋白质(如，分泌蛋白、细胞器的蛋白组份等)合成以后必须通过细胞内膜的体系输送到各部分。对于内在的膜蛋白来说，新合成的膜蛋白也必须通过类脂分子层插入到一定位置进行更新、装配。因此，研究膜的生物合成就必然牵涉到蛋白质如何通过膜的问题。下面仅就(1)蛋白质通过膜的“信号假说”(Signal hypothesis)和(2)线粒体内膜一些蛋白质生物合成的研究进展作一简单介绍。

(1) 蛋白质通过膜的“信号假说”问题是从研究真核细胞的一些分泌蛋白开始的，当不少分泌蛋白的 mRNA 在无细胞体系中进行翻译时，得到的分泌蛋白在  $-NH_2$  端多含 15—30 个氨基酸残基，称为‘前分泌蛋白’。当在这种体系中加入微粒体膜以后，多含的这部分多肽即被水解下来，而转变为分泌蛋白。后来进一步发现很多通过膜的蛋白合成时都有这种现象，而且这也不仅仅限于真核细胞。原核细胞象大肠杆菌 *E. coli* 外膜脂蛋白的合成时也有相似情况，美国 Blobel 在很多实验结果基础上提出了‘信号假说’，其要点如下：

(i) 通过膜的蛋白质在合成时，它的结构基因含有一种‘信号序列’(Signal sequences)，为合成的蛋白质的  $-NH_2$  末端的 15—30 个高度疏水的氨基酸残基提供信息。因此在相应的 mRNA 的起始密码子(initiation codon)的后面含有一段信号密码子。通过‘翻译’

过程，使新生的多肽链的  $NH_2$  端多形成 15—30 个氨基酸残基称为‘信号多肽’(Signal peptide)(见图 3)。

(ii) 翻译过程开始是在‘自由’的核糖体上进行的，一旦‘信号多肽’在核糖体大的亚单位内出现时，就使核糖体与膜相联结，从而为新生的多肽链穿越膜创造了条件(见图 3)。与此同时，膜上一些带有‘识别序列’的蛋白质组成一种临时隧道，使带有‘信号’的新生多肽得以穿越。

(iii) 穿越膜以后，‘信号多肽’即被膜中的多肽酶所水解，但蛋白质合成过程仍在与膜结合的核糖体上继续进行，新生多肽链继续延长。一旦合成完成，核糖体就与膜脱离，由膜内几个蛋白质分子组成的临时隧道也就消失。

(2) 线粒体内膜蛋白的生物合成 线粒体的生物合成的很多研究表明，它的自主性程度是很低的。酵母线粒体的基因组除线粒体 tRNA 和某些核糖体 RNA 外，只能为 7—8 个线粒体蛋白质编码，而且现已清楚，线粒体的核糖体还不能合成任何一种完整的线粒体蛋白质，而只能合成  $H^+$ -ATP 酶、细胞色素氧化酶、细胞色素  $bc_1$  复合体的几个亚单位。换言之，线粒体内含蛋白质绝大多数系由细胞核 DNA 提供信息，并在细胞质内核糖体中合成的，合成以后再通过线粒体膜运至内部进行组装。瑞士 Schatz 实验室最近与美国 Blobel 实验室合作，对酵母线粒体内膜  $H^+$ -ATP 酶的  $F_1$  组份的 3 个大亚单位，细胞色素氧化酶的 2 个亚单位以及细胞色素 c 过氧化物酶如何穿越线粒体膜分别进入线粒体基质、内膜以及内、外膜之间的空间进行了研究。他们发现，上述每一种多肽或蛋白质

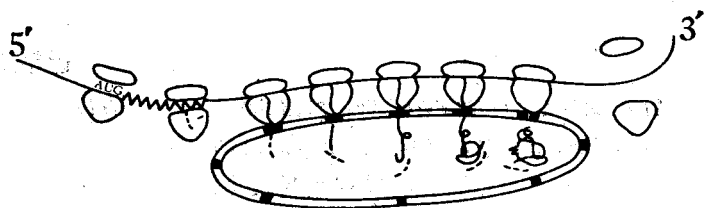


图 3 ‘信号假说’关于合成蛋白质穿越膜的图解

AUG——起始密码子；~~~~——信号密码子；————信号多肽

开始都是先合成较大的前体,通过膜以后才能转变成‘成熟’的形式。这种形式一旦形成以后就不再能穿越膜。多肽或蛋白质前体穿越线粒体膜是一个需能过程,但这一过程与(1)中所述蛋白质穿越细胞内其它一些膜系不同。新生多

肽穿越线粒体膜时,合成过程已经停止。换言之,蛋白质穿越膜的过程并不伴随合成过程。这些差异的生物学意义是什么?这是一个很有趣并值得进一步探索的问题。

## 应用免疫技术纯化特异性 mRNA

静国忠 陈建文

(中国科学院生物物理所三室)

真核基因表达的调控的研究,是分子生物学最活跃的领域之一。为了深入地对这一问题进行研究,分离特定蛋白质的信使 RNA(mRNA)及其基因(DNA)是非常之必需。由于 mRNA 分子的长度随其所编码的多肽链的长度不同而有很大的差别,因此按其分子量的大小和密度,通过密度梯度超离心的方法,从理论上来说可以得到不同的 mRNA。然而到目前为止,用此法只从特定组织或细胞中分离纯化几种蛋白质的 mRNA,如分别从网织红血球、蚕丝腺以及早期海胆胚及同步的 Hela 细胞中分离纯化了血红蛋白、丝蛋白及组蛋白等 mRNA,由于这些 mRNA 多半是这些组织和细胞中 mRNA 的主要组份,所以便于直接分离。如果从一个特定的蛋白质出发,我们是否可以得到此蛋白的基因呢?回答是肯定的!多核糖体(Polyribosome 或 Polysome 以下简称多体)免疫技术为我们分离特定蛋白质的基因,提供了一个特异的方法。其最主要的特点是,只要我们得到一个高纯度的蛋白质,通过免疫技术就可以得到此蛋白的 mRNA,再通过反转录便可得到其特定基因。多体免疫技术正不断完善,已从直接免疫沉淀法过渡到特异性更强的间接免疫吸附法(即间接免疫亲合层析法)。利用这些技术,已成功地分离纯化了鸡卵白蛋白 mRNA,小鼠骨髓瘤轻链 mRNA、鸡组蛋白 VmRNA,绵羊酪蛋白 mRNA 以及大鼠肝白蛋白 mRNA 等,

并通过遗传工程的手段将其中某些蛋白的基因(如卵白蛋白基因)进行 DNA 分子的体外重组,在大肠杆菌中得以扩增。

本文就多体免疫技术及其在 mRNA 及基因分离中的应用作一简要的评述。

### 一、多体免疫技术的一般原理

mRNA 的前体即核不均一 RNA(heterogeneous nuclear RNA)从 DNA 模板转录之后,在 PolyA 合成酶的作用下,于 3'-末端加上多聚腺苷酸,再经过选择性的降解才最后形成成熟的 mRNA,进入细胞质中。在细胞质中, mRNA 同核糖体结合形成多体,开始进行蛋白质的合成。在一个生长旺盛的细胞中,同时进行着很多蛋白质的合成,因此会有各种各样的多体。如何从中分离出合成特定蛋白质的多体呢?这就是多体免疫技术所要解决的问题。

多体免疫技术的原理就在于:特定蛋白质所产生的抗体,能特异性地同正在合成此蛋白质的多体上的新生肽链相反应,利用这一性质我们就可以分离获得此种蛋白质的多体,最后从中分离得到这种蛋白质的 mRNA。因此,我们首先应该(1)通过各种蛋白质的分离纯化技术,得到特定高纯蛋白质作为抗原物质。(2)制备无 RNase 活性的特定蛋白质的抗体。最初将家兔用特定抗原进行免疫后,用硫酸铵分部沉淀的方法得到  $\gamma$ -球蛋白组份,然后通过