

去垢剂在膜蛋白分离过程中的应用

西德 Klingenberg 教授在今年 5 月访华期间介绍了他的实验室在分离线粒体膜的 ADP/ATP 运送载体过程中应用去垢剂的经验体会。他说, Racker 实验室曾用胆酸和有机溶剂如氯丙醇等来分离 ADP/ATP 载体, 但得到的只不过是变性蛋白。慕尼黑大学 H. Weiss 曾发展了一种疏水柱层析方法来吸附膜蛋白, 然后用去垢剂分步洗脱以提取膜蛋白。这个方法能有效地分离细胞色素 b, 但产率很低。用此方法分离 ADP/ATP 载体, 却没有成功。主要的问题是, 膜蛋白分离后, 想要去除其中所含的非离子去垢剂是很困难的。另外, 某些非离子去垢剂, 例如 TrHonX_{100} 在 280nm 处有很强的紫外吸收。这样就会干扰用紫外方法来测定蛋白质的浓度。Lehninger 实验室曾报道用非离子去垢剂如 Lubrol 或 Brij 来分离 ADP/ATP 载体蛋白, 但 Klingenberg 认为, 使用这些去垢剂并不能溶解线粒体内膜。这些去垢剂的优点是无紫外吸收。虽然用这些去垢剂没有成功地分离到不变性的 ADP/ATP 载体蛋白, 但它提示可用这些去垢剂抽提除去膜上的其它蛋白质, 以此来提高 ADP/ATP 载体在膜中的相对含量。他们首先用抑制剂 Carboxyatractylate (CAT) 处理线粒体, 它能特异地与膜上的 ADP/ATP 载体结合, 并增加其稳定性。然后用不同浓度的去垢剂(例如 SDS) 处理膜, 以测定载体蛋白在膜中的相对含量的提高情况。有人称这种方法为“副的提纯法”。曾成功地被用于提取肾脏的 Na^+ , K^+ -ATP 酶。用这种方法处理所得到的肾细胞膜几乎全是纯的 Na^+ , K^+ -ATP 酶, 但同样的方法只能使线粒体膜的 ADP/ATP 载体蛋白的相对含量提高三倍。这个方法的优点是用 SDS 抽提后, 不再需要通过柱层析处理。只要把要提取的蛋白离心下来就行了。采用这种方法提纯的膜蛋白必须具备两个条件: 一是含量要高, 二是与膜紧密结合(内部蛋白)。当去垢剂浓度很低时, 一些仅仅附着在膜上的外周蛋白就很容易被溶解下来。也有人用非离子去垢剂 Lubrol 或 Brij 来分离膜蛋白, 它们能使 Na^+ , K^+ -ATP 酶从肾细胞膜上溶解, 但不能使 ADP/ATP 载体蛋白从线粒体膜上分离下来。这可能是由于 ADP/ATP 载体分子较 Na^+ , K^+ -ATP 酶小, 它更深地埋藏在膜内, 因而难于溶解。也有可能是细胞质膜含有的胆固醇具有辅助 Lubrol 或 Brij 溶解作用的功能。

当分离膜蛋白时, 选择去垢剂首先要考虑两点: 1. 去垢剂的溶解能力。2. 去垢剂的温和性, 这对保持分离膜蛋白的天然构象十分重要。例如 SDS 是一种强离子去垢剂, 具有很好的溶解能力, 但温和性不理想。去氧胆酸和胆酸都是弱的离子型去垢剂, 它们的温和性也较差。一般讲, 离子型去垢剂很容易引起蛋白变性。

在选择去垢剂时另外一个需要考虑的因素是临界团粒浓度(Critical micellar concentration CMC)。一般来说, 离子型去垢剂临界团粒浓度高, 非离子去垢剂的临界团粒浓度很低。临界团粒浓度高的去垢剂在溶液中大多以单体状态存在。这些单体进入蛋白质的可能性大, 从而使膜蛋白变性的作用也大。原则上讲, 对膜蛋白来说, 任何去垢剂都不理想, 特别是离子型去垢剂。非离子型去垢剂的团粒浓度低, 单体少, 因而使膜蛋白变性的作用也小。去垢剂对膜的溶解能力还与离子强度有密切关系。如果将蛋白/Triton 比率保持不变, 在不同的 NaCl 浓度下进行溶解线粒体膜, 结果表明: 溶解度随着 NaCl 浓度的增中而增加。也可以用 Na_2SO_4 代替 NaCl。离子强度对脱氧胆酸和胆酸的作用也有相同的影响。离子强度对去垢剂溶解质膜的作用似乎不象溶解线粒体膜那么重要, 这可能由于后者含有较多的带负电荷磷脂的缘故。对于团粒浓度低去垢剂来讲, 使用时, 去垢剂对膜磷脂的相对比例是很重要的。膜磷脂的量增加一倍, 去垢剂也要增加一倍。

为了搞清去垢剂溶解膜磷脂和膜蛋白的先后次序, Klingenberg 实验室用去垢剂分别处理三种不同的材料: 1. 用 CAT 饱和的线粒体膜。2. 未经 CAT 处理的线粒体膜。3. 双分子磷脂层。结果发现, 当去垢剂与蛋白的比例等于 1 时, 膜上的磷脂有 50% 被溶解。此时, CAT-蛋白复合体才开始被溶解。所以, 对膜的内部蛋白来说, 首先是磷脂被溶解, 然后才是蛋白被溶解。由此可以设想, 去垢剂单体分子首先“攻击”磷脂的双分子层, 使脂的双分子层变成松散, 然后才作用于 CAT-蛋白复合体上。单体与团粒在溶液中处于平衡状态, 由于单体分子先深入到双层磷脂中, 使团粒不断解离成单体。当愈来愈多的去垢剂分子深入到磷脂而形成复合的磷脂-去垢剂团粒时, 蛋白分子被包围, 最后被溶解下来。也有这样的可能, 即在去垢剂溶解膜的过程中, 整个团粒与膜融合, 但从热力学观点来讲,

这种可能性是不大的。

另外一种结构较为简单的常见去垢剂 Aminoxide, 它的分子中具有一个高度的偶极距, 本身带有离子性质。它曾被用来分离杆细胞盘状膜的视紫红质。这些去垢剂看起来比 Triton 更为有效。溶解 ADP/ATP 载体所需的浓度比 Triton 低得多, 但不如 Triton 温和。

关于去垢剂温和程度的比较, 可采用如下方法, 首先将膜上的 ADP/ATP 载体用不同的去垢剂溶解下来, 然后隔不同的时间加入 CAT, 根据结合的多少, 可

以判断载体有多少仍处于天然状态。实验结果表明, 一小时后, 用 Triton 抽提的 ADP/ATP 载体还有 60% 仍处于天然状态。用 Aminoxide 溶解的还有 15%, 用胆酸盐溶解的结合最低。由此可以比较不同去垢剂的温和程度。

综上所述, 使用去垢剂来溶解膜蛋白质时, 必须考虑各种因素, 加以选择。根据 Klingenberg 等的经验, 溶解线粒体膜 ADP/ATP 载体蛋白以 TritonX₁₀₀ 的效果最为理想。

(中国科学院生物物理所 程秋霖整理)

科技消息

在伯克利成立了新的电镜中心

继去年建立了 1MeV 原子分辨显微镜之后, 劳伦斯伯克利实验室 (LBL) 今年又建成了 1.5MeV 高压电镜 (HVEM), 材料科学和生物学家用它研究样品时将更逼真。尽管 500KeV 以上都被称为高压电镜, 但至今还没有一台高过 HVEM, 也没有一台能分辨原子 (阿贡实验室有一台 1.2MeV, 橡树岭有一台研究金属及合金辐射损伤用的 1MeV 高压电镜, LBL 的二台电镜都在能源系。这几台电镜各有特色。例如阿贡实验室适合于

配合离子加速撞击研究金属材料。用于生物学研究则只有纽约州大学 1.2MeV 电镜, 及威斯康辛大学及卡罗拉多大学的 MeV 电镜。美国一共有 50 台高压电镜, 其中 39 台是日本或欧洲制造。HVEM 系由英国和瑞士研制成。生物学家利用这台电镜进行厚样品研究而不需要做连续切片。因其有高穿透力, 材料学家和固体物理学家也愈来愈对所谓“原位” (in sim) 研究感兴趣。比如研究氧化就不再需要放在炉子里烧。这种高压电镜有二个好处, 一是样品室非常大, 像一个小型实验室, 里面是高温高压。二是穿透的能量高, 可以研究较厚的样品。但对研究生物样品还有一个没有解决的问题, 即生物样品会受到电子的高能量辐射损伤。

沈淑敏摘自 *Sci.* **211** (4489) (8)

会议和短训班消息

1. 欧洲分子生物学组织将于 1981 年 10 月 6—9 日在法国巴黎附近的都丹 (Dourdan) 召开 “DNA 复制及其控制的比较解剖学” 专题讨论会, 目的是展望不同复制子所用引发复制及其速率控制方法方面的分子机理, 内容将涉及广谱系统发育领域。讨论会包括报告会和墙报介绍。以交流报告者本人工作和墙报内容为主。

2. 1982 年将要召开的一些会议:

会议内容	时间	地点	联系人及主办单位
国际脑研究会议	4 月	瑞士 Lausarne	I. B. Ro 主办
第五届国际植物组织及细胞培养会议	7 月	日本	东大植物系 A. Komamine 教授
第十二届国际生化会议	8 月 15 日	澳大利亚 Perth	W. J. Whelan Miaui Florida 33101 μ 5A
第二届国际生物体系中水及离子会议	9 月 6 日	罗马尼亚布加勒斯特	罗马尼亚医学科学协会主办
第十三届国际肿瘤会议	9 月 9 日	美国 Seattle	E. A. Mirand, Roswell Park memorial

3. 膜现象基础训练班将与意大利膜科学和技术小组, 于 1981 年 10 月 8—10 日在意大利阿科德兰多 [Arco (Trenro)] 共同举办第二期生物膜中的运输现象、模式系统和重建短训班。主题包括: 模式系统与生物膜的比较; 模式系统的运输特性; 膜运输功能的重建; 模式系统在制药学中的应用。

刘蓉、沈淑敏摘自 *Nature*, **290**, XX VIII, 1981. 等