

猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 的磷脂及脂肪酸的组成

鲍 风 文德成 张 克 许永瑞

(中国科学院生物物理研究所)

近年来在生物膜的研究中,人们已广泛利用脂质体作为简单的研究模型。杨福愉等同志^[1]将分离提纯的猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 成功地组装在脂质体上。为深入研究膜的结构与功能,膜蛋白与脂类之间的相互关系,进一步了解猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 在嵌入脂质体之前,它的磷脂及脂肪酸组成的情况是十分必要的。

Marinetti 等^[2]曾利用硅胶纸层析分析过猪心线粒体的磷脂组成。但对猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 的磷脂及脂肪酸组成的情况,尚未见文献报道。本文用一组酸性氯仿甲醇溶剂体系、单向硅胶薄层层析、薄层色谱扫描和三氟化硼酯化法分析了猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 的磷脂和脂肪酸的组成。

一、材料与方 法

1. 材料、试剂

(1) 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) (以下简称疏水蛋白 (F_0)) 样品由中国科学院生物物理研究所三室杨福愉等同志提供。详见参考文献 [1]。

(2) 疏水蛋白 (F_0) 的总磷脂 用疏水蛋白 (F_0) 10—20mg, 参照 Bligh-Dyer^[3] 方法抽提总脂。抽出液用苯稀释后,在 30℃ 以下用氮气除去溶剂。以 10—20 倍容积的冷丙酮洗涤数次,以氮气除去残余的丙酮,沉淀加少量氯仿或苯溶解后供分析使用。

(3) 参考用磷脂样品 PC (磷脂酰胆碱) 和 PE (磷脂酰乙醇胺) 为英国 BDH 生化试

剂。PI (磷脂酰肌醇) 和 LPC (溶血磷脂酰胆碱) 为美国 Avanti 生化试剂。DPG (双磷脂酰甘油) 和 SM (神经鞘磷脂) 为美国 Sigma 化学公司产品。

(4) 参考用脂肪酸甲酯样品 12:0 (月桂酸)、16:1 (棕榈烯酸)、18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、18:2 (亚油酸) 和 18:3 (亚麻酸) 均为西德 Serva 产品。14:0 (豆蔻酸) 和 16:0 (棕榈酸) 的甲酯样品用三氟化硼酯化法^[4]从脂肪酸制备。

2. 方法

(1) 磷脂组成定性分析 用薄层色谱法。单向层析用 4.5 × 15cm/cm、双向层析用 7 × 7 cm/cm 碱性硅胶薄板。点样量: 疏水蛋白 (F_0) 总磷脂 20—30 μg, 参考磷脂样品 2—5 μg。展开剂: C (氯仿):M 甲醇:A (冰乙酸):W (水) 容积比为 50:25:10:2。显色: 用 10% 磷钼酸乙醇溶液和 Dittmer-Lester 试剂^[5]。

(2) 磷脂组成定量分析 用薄层色谱扫描法。薄层色谱条件与定性分析时基本相同。使用岛津 CS-900 型薄层色谱扫描仪。测定波长 λ_s 650nm, λ_R 475nm, 狭缝 6.7 × 0.2mm, 扫描方式线性,灵敏度 × 1,扫描速度 40 毫米/分,记录速度 40 毫米/分。

(3) 脂肪酸组成分析 由疏水蛋白 (F_0) 抽出的总脂 0.2—0.5 mg 用三氟化硼甲醇快速酯化^[4]后,用 SP 2305 型气相色谱仪进行气相色谱分析。分离柱: 长 3 米,内径 4 毫米,柱内填充涂有 18% DEGS 的 Chromosorb W. Aw. DMCS. 60—80 目的担体。用氢焰离子鉴定器。柱温 196℃。载气: 高纯氮,流速 70 毫升/分。

二、结果与讨论

1. 磷脂组成定性分析

疏水蛋白 (F_0) 总磷脂按前述薄层色谱条件进行单向层析的结果见图 1。

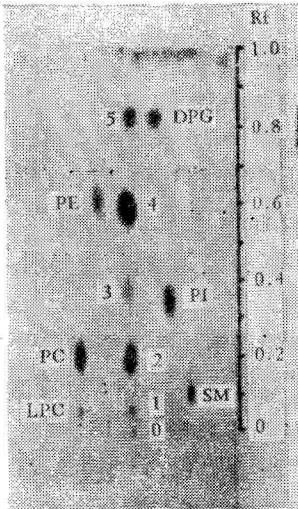


图 1 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 的各种磷脂组分与参考磷脂样品对照的薄层色谱

从图 1 可见疏水蛋白 (F_0) 总磷脂 (样品点 0) 共分出 5 个组分 (原点 0 除外)。经 DiItn-er-Lester 试剂显色均为阳性, 表明各组分均为

磷脂。与参考磷脂样品对照, 从组分 1 到组分 5 分别与溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺和双磷脂酰甘油等参考磷脂样品的 R_f 值一致。

以上经单向薄层层析分离出的各磷脂组分有无其他组分重叠, 经酸性和碱性两种溶剂体系进行双向层析的结果见图 2。

从图 2 可见经过双向层析没有新的脂质组分出现。表明以上经单向层析分离出的各种磷脂组分是单一的。

2. 磷脂组成定量分析

疏水蛋白 (F_0) 总磷脂的单向薄层色谱经薄层色谱扫描仪扫描, 结果见图 3。

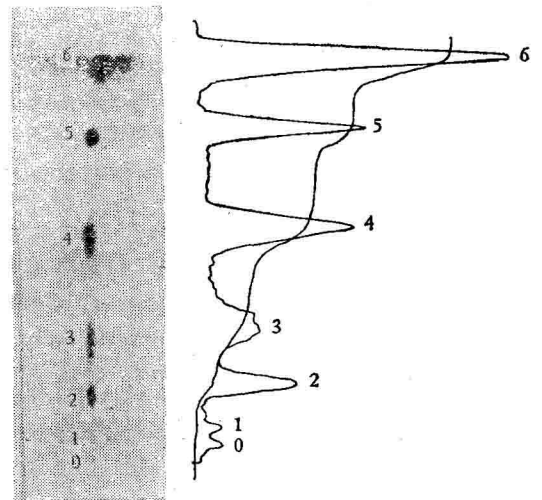


图 3 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 各磷脂组分薄层色谱扫描的图谱

0 原点, 1 LPC, 2 PC, 3 PI, 4 PE, 5 DPG, 6 中性脂类

由于各种磷脂的分布密度不同, 对磷钼酸显色剂的显色强度不尽一致。尤其磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺差异较大。我们用已知量的各种磷脂参考样品的色谱峰对各种磷脂色谱峰的面积进行了校正。各种磷脂的百分含量用面积归一化法计算的结果如表 1 (三次实验的平均值)。

从表 1 可见, 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 的磷脂组成主要为磷脂酰胆碱 (35.46%)、磷脂酰乙醇胺 (32.69%) 和双磷脂酰甘油 (22.92%), 三种磷脂合计达 90% 以上。

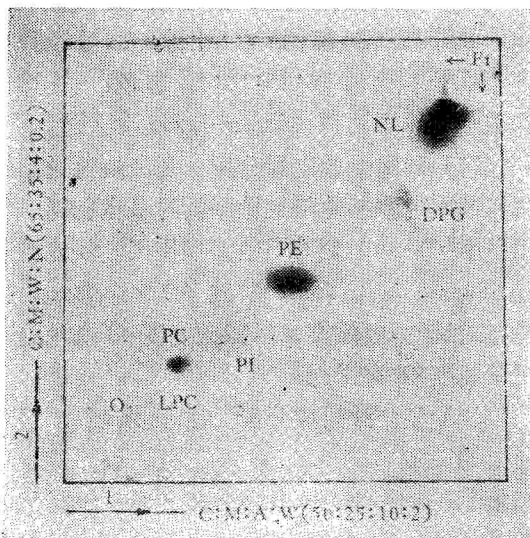


图 2 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F_0) 总磷脂的双向薄层色谱

○ 原点, NL 中性脂类, Fr 溶剂前沿, N 氢氧化铵 (28%)

表 1 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的磷脂组成

薄层色谱 斑点号	斑点的比 移值 (R _f)	磷脂组分	薄层扫描 色谱峰号	磷脂含量 (重量%)
0	0	un	0	0.72±0.03
1	0.05	LPC	1	1.09±0.04
2	0.20	PC	2	35.46±0.67
3	0.37	PI	3	7.12±0.22
4	0.59	PE	4	32.69±0.82
5	0.83	DPG	5	22.92±0.66

un:未检出。

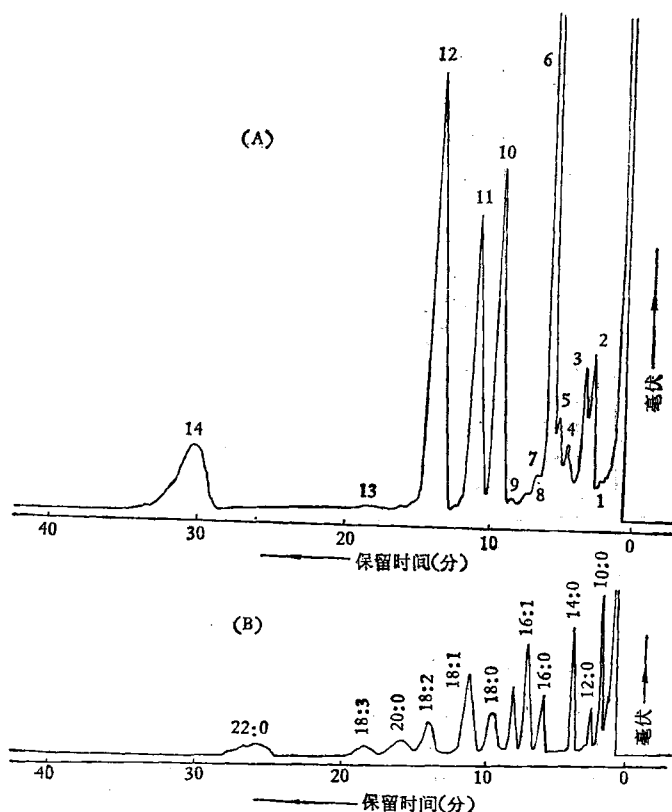


图 4 (A) 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸组成的气相色谱 (B) 同一色谱条件下各种参考用脂肪酸甲酯样品的气相色谱

还有小量的磷脂酰肌醇 (7.12%)、溶血磷脂酰胆碱 (1.09%) 和微量的未检出磷脂组分 (0.72%)。

3. 总脂肪酸组成的分析

(1) 总脂肪酸组成定性分析 疏水蛋白 (F₀) 的总脂肪酸经三氟化硼甲醇试剂甲酯化后, 在前述气相色谱条件下进行气相色谱分析。结果如图 4。

从图 4(A) 可见猪心线粒体 ATP 酶复合

体疏水蛋白 (F₀) 的总脂肪酸各色谱峰的保留值和图 4(B) 已知的各种脂肪酸甲酯色谱峰的保留值对照, 显然猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸组成中, 1、3、6、7 和 10—13 号色谱峰分别与月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、棕榈烯酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等已知的脂肪酸色谱峰的保留值一致。此外根据部分脂肪酸甲酯的碳原子数与比保留值对数的线性关系推测, 5、9 和 14 号色谱峰分别为十四

碳烯酸、十六碳二烯酸和廿碳三烯酸。

(2) 总脂肪酸组成定量分析 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸中各种脂肪酸的含量, 用面积归一化法计算的结果如表 2 (三次实验的结果)。

表 2 猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的总脂肪酸组成

色谱峰号	色谱峰的比保留值 (18:0=1:00)	标准脂肪酸甲酯色谱峰的比保留值 (18:0=1:00)	脂肪酸组分	脂肪酸含量 (重量%)
1	0.23	0.23	12:0	Tr
2	0.31		un	3.42±0.07
3	0.37	0.37	14:0	3.97±0.02
4	0.50		un	0.89±0.04
5	0.55		(14:1)	0.35±0.03
6	0.61	0.61	16:0	15.86±0.20
7	0.72	0.73	16:1	0.28±0.02
8	0.79		un	0.16±0.02
9	0.90		(16:2)	0.15±0.02
10	1.00	1.00	18:0	16.19±0.08
11	1.16	1.16	18:1	16.38±0.10
12	1.46	1.46	18:2	30.68±0.31
13	1.93	1.92	18:3	0.34±0.04
14	3.22		(20:3)	11.33±0.16
不饱和脂肪酸含量 (重量%)			63.98±0.81	
饱和脂肪酸含量 (重量%)			36.02±0.28	

un: 未检出, Tr: 痕量 (0.10% 以下)

从表 2 可见, 在猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸中, 亚油酸含量最高 (38.68%), 其次是油酸 (16.38%)、硬脂酸 (16.19%) 和棕榈酸 (15.86)。在高度不饱和酸方面亚麻酸含量很低 (0.34%), 但廿碳三烯酸含量却相当高, 达 11.39%。此外含有小量的豆蔻酸、微量的十四碳烯酸、十六碳烯酸、十六碳二烯酸以及十六碳以下的微量未检出组分。总

脂肪酸中不饱和脂肪酸占 64%, 饱和脂肪酸占 36%。

Kagawa 等^[6]分析过牛心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的磷脂及脂肪酸的组成。在磷脂组成方面他们只作了粗略的分析, 只分出卵磷脂与脑磷脂 (Cephalin) 两个组分, 难与猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的磷脂组成进行比较。从脂肪酸组成的情况看, 两者的棕榈酸、硬脂酸和不饱和脂肪酸含量均比较近似。但牛心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的油酸含量最高 (30.9%), 而猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 的亚油酸含量最高 (30.68%)。另外在廿碳脂肪酸方面均有一个明显的色谱峰, 前者为廿碳四烯酸, 含量 5%。而后者为廿碳三烯酸, 含量 11.5%。显然猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸的不饱和度较牛心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 总脂肪酸的不饱和度为高。

本文所用猪心线粒体 ATP 酶复合体疏水蛋白 (F₀) 样品由中国科学院生物物理研究所三室一组同志制备, 特此致谢。

参 考 文 献

[1] 杨福愉等: 《生物化学与生物物理学报》 12, 193, 1980。
[2] G. V. Marinetti et al.: *J. Biol. Chem.*, 233, 562. 1958.
[3] E. G. Bligh et al.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911, 1959.
[4] L. D. Metcalf et al.: *Anal. Chem.*, 33, 363, 1961.
[5] J. C. Dittmer et al.: *J. Lipid Res.*, 5, 126, 1964.
[6] Yasuo Kagawa et al.: *J. Biol. Chem.*, 241, 2461. 1966.

(本文于1983年1月28日收到)