

研究快报

高活性 F_1 -ATP 酶单分子旋转初步观察*

王兴胜** 崔元波** 张英豪 乐加昌*** 江丕栋

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 从基因突变的 F_1 -ATP 酶 (基因突变质粒, α -C193S, γ -S107C, β 亚基带有 10 个组氨酸标记 (His-Tag), 转入到菌株大肠杆菌 JM103) 的菌株中筛选出一高表达菌株. 该菌株表达的 F_1 -ATP 酶经纯化后其水解活性明显高于文献值. 从单分子水平上进行观察, 发现在水解 ATP 过程中, γ 亚基上连接的荧光标记蛋白微丝, 其旋转速度要比文献中同样条件下快约一倍.

关键词 F_1 -ATP 酶, 分子马达, 单分子技术

学科分类号 Q77

自 1997 年日本科学家 Noji 等^[1]发表了单分子水平上直接观察 F_1 -ATP 酶旋转以后, 世界上已有多家实验室在不同条件与环境下重复和发展了此项研究^[2~4]. 用单分子技术可以观察到在 F_1 -ATP 酶水解 ATP 过程中, 其 γ 亚基连接的荧光标记的微丝快速地旋转: 每水解一个 ATP 分子产生的能量可以使荧光标记的微丝旋转 120° ^[3]. 众所周知, 单分子水平研究 F_1 -ATP 酶结构与功能不但具有重要的理论意义, 而且具有重要的潜在应用价值. F_1 -ATP 酶是世界上至今为止已发现的最小分子马达, 它的能量利用率几乎达 100%, 是无磨损生物马达. 这些特点被纳米电机系统科学家们所看好. 早在 1999 年, 美国康奈尔大学 Montemagno 教授就将生物马达组装成纳米电机设备. 最近他们将高分子材料聚甲基丙烯酸甲酯涂上金属镍 (类似于直升飞机的螺旋桨), 并把 F_1 -ATP 酶整齐地点在长 60 nm、宽 600 nm、高 4~20 nm 芯片的阵列上, 观察到水解 ATP 时螺旋桨快速地旋转^[4].

研究表明, 当 F_1 -ATP 酶带有 His-Tag 时, 其活性大约是正常值的 60%^[5]. 而单分子水平研究必须将 F_1 -ATP 酶固定在玻璃表面, 这里主要是用 His-Tag 去连接玻璃表面上的辣根过氧化物酶所连接的镍亲和树脂 (horseradish peroxidase-conjugated Ni-NTA, HRP-conjugated Ni-NTA). 因此, 为了提高 F_1 -ATP 酶的研究水平, 就必须提高 F_1 -ATP 酶活性. 有文献报道加适当浓度二甲基十二烷基胺氧化物 (lauryl dimethyl amine oxide, LDAO) 作为

F_1 -ATP 酶的激活剂, 但是 LDAO 的存在反过来又会影响 F_1 -ATP 酶在玻璃表面的固定. 因此纯化高活性的 F_1 -ATP 酶对于在单分子水平上研究 F_1 -ATP 酶的行为显得十分重要.

1 材料与方法

1.1 材料

工程化 F_1 -ATP 酶 (α , β , 和 γ 亚基): 来自嗜热菌 *Bacillus* PS3 的 F_1 -ATP 酶 γ 亚基 Ser107 定点突变为 Cys, α 亚基 Cys193 定点突变为 Ser, β 亚基 N 端连接 10 个组氨酸. 突变质粒 pGEM-MH 克隆到表达质粒 pQE-30, 表达载体 pQE-MH 整合到已去除主要 F_1 -ATP 酶基因的 *Escherichia coli* JM103 $\Delta(uncB-uncD)$ 上. 上述工程菌由 Montemagno 教授^[5]惠赠.

肌动蛋白 (actin) 纯化: 利用肌动蛋白在一定的条件下聚合/解聚的特点纯化^[6]. 从兔肌肉中提纯, 得到单体肌动蛋白 (G-actin), 纯度大约为 90%.

试剂: 顺丁烯乙基修饰的氨基化生物素 (biotin-PEAC₅-maleimide, Dojindo 公司产品), Ni-NTA (Qiagen 公司产品), 链霉抗生物素蛋白

* 国家自然科学基金 (19890380-4, 30240042; 39730160-II) 和中国科学院生物物理研究所所长基金资助项目.

** 对此论文有同等贡献.

*** 通讯联系人. Tel: 010-64888515, Fax: 010-64872062

E-mail: yuejc@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2002-12-17, 接受日期: 2002-12-26

(streptavidin)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP)、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、ATP、还原型辅酶 I (the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 和乳酸脱氢酶 (L-lactic dehydrogenase, LDH) 均购自 Sigma 公司, 其余为国产分析纯以上产品。

流动小池: 玻璃片清洗方法见文献 [7]。流动小池高约 0.5 mm, 面积约为 0.16 cm²。

1.2 细菌的筛选与 F₁-ATP 酶的纯化

工程菌在 M9 培养基皿上生长, 挑选出一单克隆菌株。然后在 2×YT 培养基中 (50 g/L 氨苄青霉素) 37℃ 培养 3~4 h, 至 A₆₆₀ 值在 0.6~0.8 之间。再加入 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG) 诱导 3 h。4 000 g 离心 15 min 后收集沉淀。用缓冲液 A (Buffer A, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 将沉淀悬浮后, 加入溶菌酶至 1 g/L, 4℃ 孵育 30 min 后, 再加入 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF), 超声 90 s。60℃ 保温 30 min。在 3 300 g 离心 30 min 25℃, 弃沉淀。

用 Ni-NTA 亲和柱纯化 F₁-ATP 酶 (在室温下进行): 将 Ni-NTA 亲和柱用 Buffer A 平衡, 将上清缓慢通过 Ni-NTA 亲和柱 (0.5 ml/min), 依次用 2 倍体积的 Buffer A, 10 倍体积的 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L 咪唑洗脱, 洗杂蛋白, 最后用 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 120 mmol/L 咪唑洗脱, 得到 F₁-ATP 酶。

1.3 F₁-ATP 酶的 ATP 水解活性测定

按文献 [8] 方法。

1.4 观察单分子 F₁-ATP 酶旋转实验方法

按文献 [9] 方法并加以改进 (旋转体系模式见图 1)。

单体肌动蛋白生物素化: 10 μmol/L G-actin 与 50 μmol/L biotin-PEAC₅-maleimide 在 1 mmol/L Hepes-KOH (pH 7.2), 100 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂ 体系中室温下反应 2 h。

单体肌动蛋白标记 FITC 及其聚合: 生物素化 G-actin 与终浓度为 0.1 mmol/L FITC 及 2 mmol/L ATP 在 4℃ 过夜聚合。聚合后产生荧光标记的微丝 (F-actin)。

生物素化 F₁-ATP 酶: 将 0.02 μmol/L 的 F₁-ATP 酶加入 0.06 μmol/L 的 biotin-PEAC₅-

maleimide 在室温中处理 2 h (反应在 20 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.2 缓冲体系中进行)。

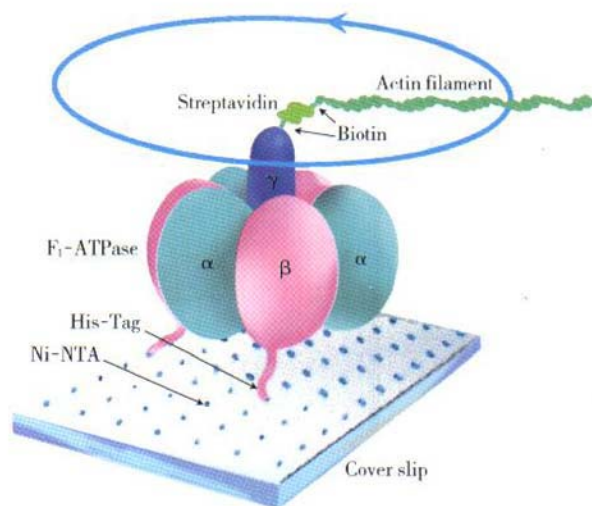


Fig. 1 The system used for observation of F₁-ATPase rotation

包埋载玻片: 用硝酸纤维素 (5.45 μg/L) 包埋载玻片 10 min 后用双蒸水冲洗流动小池, 再用缓冲液 B (Buffer B, 10 mmol/L Hepes-NaOH, pH 7.2, 25 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂) 洗 3 次。

载玻片连接 Ni-NTA: 将溶于 Buffer B 的 0.2 μmol/L HRP-conjugated Ni-NTA 加入流动小池中, 室温放置 2 h, 再用 Buffer B 洗 3 次。

载玻片用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 处理: 将流动小池中加入 10 g/L BSA, 4℃ 过夜, 再用 Buffer B 洗 3 次。

Ni-NTA 连接生物素化的 F₁-ATP 酶: 将约 2 nmol/L 生物素化的 F₁-ATP 酶加入流动小池中室温放置 1 h, 后用 50 mmol/L 咪唑洗 3 次, 再用 Buffer B 洗 3 次。

生物素化的 F₁-ATP 酶上连接 streptavidin: 流动小池中加入溶于 Buffer B 的 0.2 μmol/L streptavidin, 连接 30 min 后, 再用 Buffer B 洗 3 次。

Streptavidin 连接荧光标记生物素化的 F-actin: 将荧光标记生物素化的 F-actin 加入流动小池中, 室温连接 1 h 后, 再用 Buffer B 洗 5 次。

启动反应: 流动小池中加入 2 mmol/L ATP-50 mg/L PK-1 mmol/L PEP-10 mmol/L MgCl₂ (溶于 Buffer B 中)。其中一组不加 NaN₃, 另一组加入 5 mmol/L NaN₃。

观察 F_1 -ATP 酶旋转: 在倒置荧光显微镜 Olympus IX71 (或 BO3) 下观察 ($40\times$), 用电荷偶合组件 (charged coupled device, CCD, MicroMax: 782YHS, Princeton Instruments) 记录。

2 结果

2.1 F_1 -ATP 酶的 ATP 水解活性

从图 2 中可以看到, 纯化的 F_1 -ATP 酶有 3 个亚基 (α , β 和 γ 亚基)。图 3 表示纯化的 F_1 -ATP 酶的 ATP 水解活性达到 6 U/mg (测定温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 缓冲体系为 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.15 mmol/L NADH, 0.4 mmol/L PEP, 2 mmol/L ATP, 4 U LDH 和 4 U PK)。

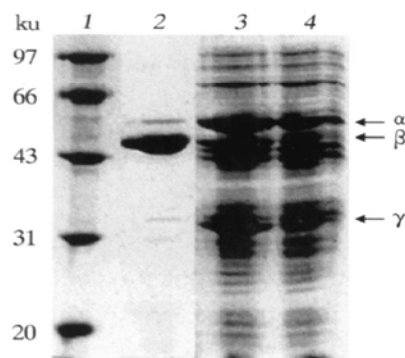


Fig. 2 SDS PAGE (15%) of the F_1 -ATPase

1: molecular mass marker; 2: purified F_1 -ATPase; 3: after induced; 4: before induced.

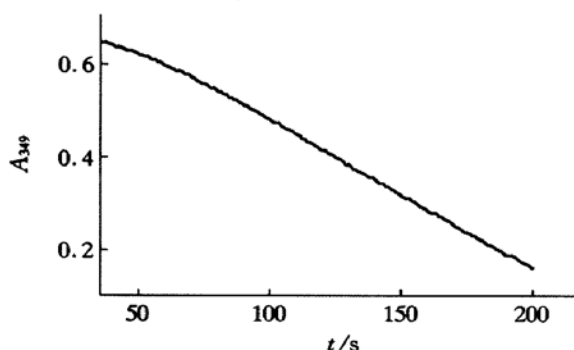


Fig. 3 The ATP hydrolysis activity of F_1 -ATPase

2.2 F_1 -ATP 酶主要生化特性

已有文献报道 LDAO 可以将野生型 F_1 -ATP 酶水解活性提高约 4 倍, 但对突变型 F_1 -ATP 酶则表现明显抑制作用^[10]. 对本研究的突变型 F_1 -ATP 酶活性与 LDAO 的关系到目前未见任何文献报道. 图 4a 表明当 LDAO 的浓度在 0.001% 以下时, 随着 LDAO 的浓度增加 F_1 -ATP 酶水解也增加, 其增

加最高值为 25%. 继续增加 LDAO 的浓度至 0.01% 后, F_1 -ATP 酶水解的活性反而下降. NaN_3 浓度的变化对 F_1 -ATP 酶活性的影响结果如图 4b 所示, NaN_3 浓度的增加 (0~2 mmol/L), 其 F_1 -ATP 酶水解的活性迅速下降, 继续增加 NaN_3 浓度, 对 F_1 -ATP 酶水解的活性抑制近 70%.

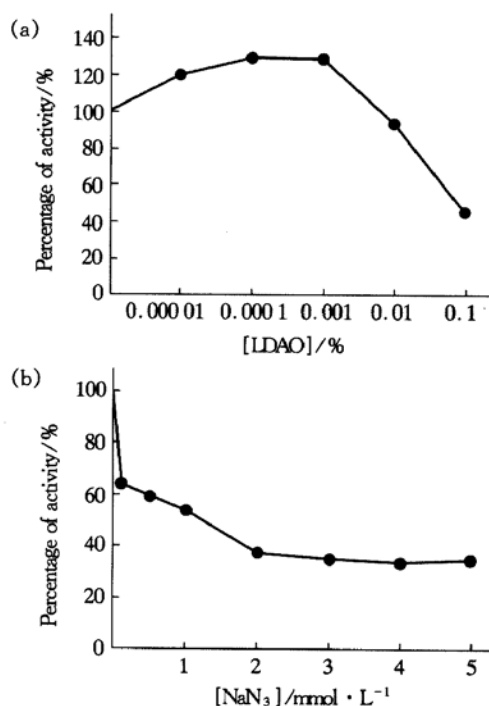


Fig. 4 The effect of concentration of LDAO (a) and NaN_3 (b) on the ATP hydrolysis activity of F_1 -ATPase

2.3 单分子水平研究 F_1 -ATP 酶水解时逆时针方向旋转

图 5 为在 F_1 -ATP 酶水解 ATP 时, 其 γ 亚基上连接荧光标记的微丝旋转的累计角度图. 从图 5 可以看到荧光微丝旋转速度不是一个常数, 有停顿, 偶尔还有反转. 同时加 ATP 和 5 mmol/L NaN_3 时, 基本抑制 F_1 -ATP 酶的旋转 (L8). 在不加 ATP 的体系中观察不到微丝旋转 (数据未列入). 我们将上述结果整理在表 1, 从而可以看到在微丝长为 3.70 μm 时, 荧光微丝旋转速度为每秒旋转 0.94 转, 旋转扭矩为 57 pN $\cdot$ nm. 图 6~8 为图 5 曲线 L3 荧光标记微丝随时间旋转图及方向示意图.

对未加抑制剂的体系, 可以观察其持续旋转大约为 10 min 左右. 对显微镜视野中 31 个荧光标记微丝进行分析, 旋转微丝数占 45%.

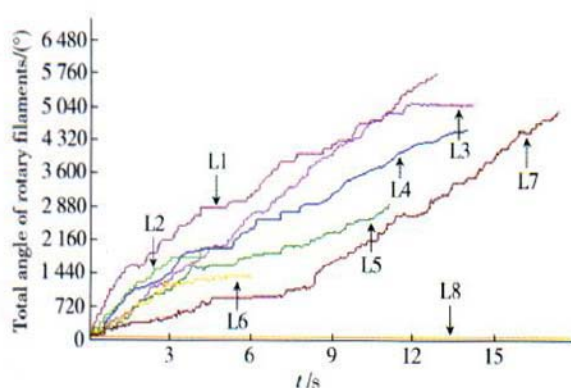


Fig. 5 The total angle of the rotation filaments with the time increasing

Table 1 The parameters of the filaments

No.	t (rotary) / s	L (filament) / μm	Rotary rate / r. p. s.	Rotary torque $\text{pN} \cdot \text{nm}^{1)}$
L1	13	4.00	1.23	93
L2	4	2.91	1.25	38
L3	14	3.20	1.00	41
L4	14	3.53	0.93	50
L5	11	4.47	0.73	76
L6	6	4.50	0.67	71
L7	17	3.60	0.82	46
L8 ²⁾	48	3.35	~ 0	—
Total ³⁾	79	3.70	0.94	57

¹⁾The frictional torque for the filament rotation is given, in the simplest approximation, by $(2n\pi^2/3) \eta L^3 / [\ln(L/2r) - 0.447]$, where n is the rotary rate, η ($10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$) the viscosity of the medium, L the length of actin filament, and r (5 nm) the radius of the filament^[11].

²⁾In the presence of 2 mmol/L ATP and 5 mmol/L NaN_3 for these control experiments. ³⁾L8 not included.

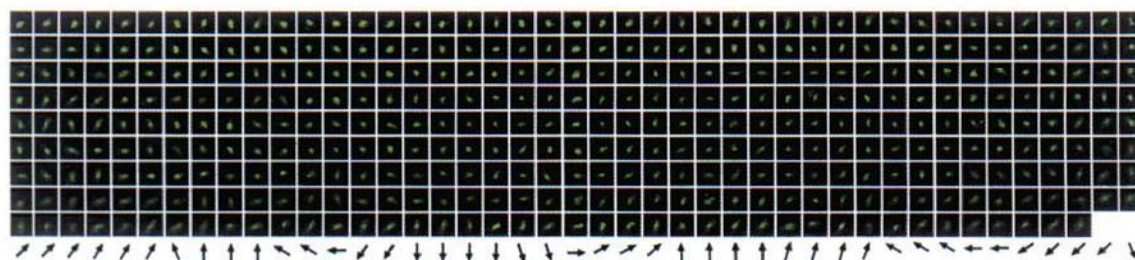


Fig. 6 The images of fluorescent filament of L3 and the rotation angle of the first row images

Time interval between images is about 0.037 s.

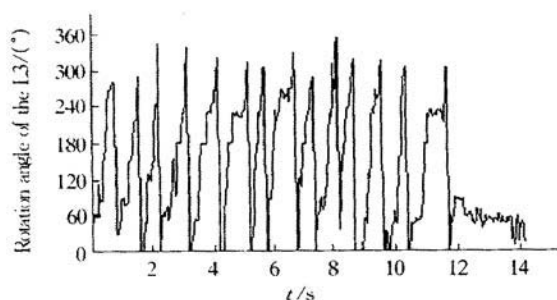


Fig. 7 Rotation angle of fluorescent filament of L3

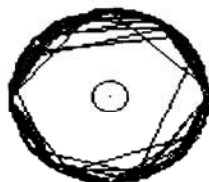


Fig. 8 Fluorescent filament L3 rotation

3 小 结

在本研究中筛选出一株高质量的 F_1F_0 ATP 酶菌株, 纯化后, 其水解活性要比文献 (一般 PS3 F_1F_0 ATP 酶水解活性在同样条件下约为 $3 \text{ U/mg}^{[5,8,11]}$) 高近 1 倍. 在单分子水平上研究, 发现该酶的旋转速度大约为 1 转/s, 该值比 Noji 发表在《Nature》上长为 $3 \mu\text{m}$ 的微丝旋转速度快约 1 倍. 有关进一步单分子详细研究有待下一步完成.

致谢 本研究得到杨福愉院士热情鼓励, 并得到曹恩华教授和秦静芬老师在仪器使用上给予的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Noji H, Yasuda R, Yoshida M, *et al.* Direct observation of the rotation of F_1F_0 -ATPase. *Nature*, 1997, **386** (20): 299~302

- 2 Yasuda R, Noji H, Kinosita K, *et al.* F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell*, 1998, **93** (7): 1117~ 1124
- 3 Yasuda R, Noji H, Kinosita K, *et al.* Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase. *Nature*, 2001, **410** (19): 898~ 903
- 4 Bachand G D, Soong R K, Neves H P, *et al.* Precision attachment of individual F₁-ATPase biomolecular motors on nanofabricated substrates. *Nano Letters*, 2001, **1** (1): 42~ 44
- 5 Montemagno C, Bachand G. Constructing nanomechanical devices powered by biomolecular motors, *Nanotechnology*, 1999, **10** (3): 225~ 231
- 6 James A S, Susan W. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J Biol Chem*, 1971, **246** (15): 4866~ 4871
- 7 Taekjip H. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods*, 2001, **25** (1): 78~ 86
- 8 Matsui T, Yoshida M. Expression of the wild-type and the Cys/Try-less $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of thermophilic F₁-ATPase in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1231** (2): 139~ 146
- 9 Hirono-Hara Y, Noji H, Nishiura M, *et al.* Pause and rotation of F₁-ATPase during catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (24): 13649~ 13654
- 10 Jear Michel J, Chao D, Neil B, *et al.* The $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of the F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 with the T165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 28818~ 28824
- 11 Miwa K, Yoshida M. The $\alpha_3\beta_3$ complex, the catalytic core of F₁-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (17): 6484~ 6487

Direct Observation on Single Molecular Rotation of High Activity F₁-ATPase*

WANG Xing-Sheng**, CUI Yuan-Bo**, ZHANG Ying-Hao, YUE Jia-Chang***, JIANG Pei-Dong

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The high activity F₁-ATPase (the mutant α -C193S, γ -S107C, a ten histidine (His) tag inserted immediately downstream of the β initiation codon, $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex) of thermophilic *Bacillus* PS3 was purified from *E. coli* JM103 Δ (*uncB-uncD*), in which the majority of F₁-ATPase genes have been eliminated. It was found that the enzyme hydrolyzed ATP more efficiently than previous papers. During the F₁-ATPase hydrolyzing ATP, the rotary rate of the fluorescent actin filament attached to γ subunit of F₁-ATPase was about one times faster than that of previous papers in the similar conditions.

Key words F₁-ATPase, molecular motor, single molecular technique

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (19890380-4, 30240042; 39730160-II) and The Foundation of Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences.

** These two authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author. Tel: 86-10-64888515, Fax: 86-10-64872062, E-mail: yuejc@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 17, 2002 Accepted: December 26, 2002