



杨福愉 主编
黄 芬

膜脂—膜蛋白 相互作用及其在 医学和农业上的应用

山东科学技术出版社

膜脂－膜蛋白相互作用及其在 医学和农业上的应用

杨福愉 主编
黄 芬

山东科学技术出版社

**膜脂—膜蛋白相互作用及其在
医学和农业上的应用**

杨福愉 主编
黄 芬

*

山东科学技术出版社出版
(济南市玉函路 邮政编码 250002)

山东省新华书店发行

山东新华印刷厂潍坊厂印刷

*

787×1092 毫米 16 开本 26.75 印张 4 插页 597 千字
1996 年 10 月第 1 版 1996 年 10 月第 1 次印刷
印数: 1—1000

ISBN 7—5331—1733—6

Q·19 定价 60.00 元

主编 杨福愉 黄 芬

编著 (按姓氏笔画排列)

于振宝 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
卫翔云 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
王可玢 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
王 红 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
公衍道 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
冯立明 (中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005)
汤佩松 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
匡廷云 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
许彩民 (中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室 北京 100005)
邢善如 (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)
吕照江 (北京协和医院 北京 100005)
许春辉 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
孙龙华 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
关志英 (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)
杨福愉 (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)
陈建文 (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)
陈志强 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
苏雅娴 (北京医科大学细胞生物学教研室 北京 100083)
张秀芳 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
张日清 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
张 红 (河北农业大学 保定 071001)
沈子威 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
李 路 (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)
杨丹慧 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
林克椿 (北京医科大学生物物理系 北京 100083)
林世青 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
郑连兴 (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)
赵南明 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
赵福洪 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
聂松青 (北京医科大学生物物理系 北京 100083)
唐崇钦 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
徐育敏 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
黄 芬 (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)
黄有国 (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)
屠亚平 (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)
隋森芳 (清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)
童俊超 (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)
彭德川 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
戴云玲 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
简令成 (中国科学院植物研究所 北京 100093)
潘华珍 (中国医学科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室 北京 100005)

山东省泰山科技专著出版基金会

名誉会长 赵志浩 宋木文 陆懋曾 伍 杰 卢鸣谷 董凤基 宋法棠
会 长 陈光林 石洪印
副 会 长 宋桂植 何宗贵 吕可英 车吉心 孙肇琨 王为珍（常务副会长）
秘 书 长 王为珍（兼）
副秘书长 尹兆长
理 事 （以姓氏笔画为序）
王为珍 王凤起 尹兆长 刘韶明 李道生 李德泉 张传礼
陈 刚 蒋玉凤
评审委员会 （以姓氏笔画为序）
卢良恕 吴阶平 杨 乐 何祚庥 罗沛霖 高景德 唐敖庆
蔡景峰 戴念慈

山东省泰山科技专著出版基金会赞助单位

山东省财政厅

山东省出版总社

山东省科学技术委员会

山东科学技术出版社

山东泰山酿酒饮料集团总公司

董事长兼总经理张传礼

山东金泰集团股份有限公司

董事长兼总裁刘黎明

我们的希望

进行现代化建设必须依靠科学技术。作为科学技术载体的专著，正肩负着这一伟大的历史使命。科技专著面向社会，广泛传播科学技术知识，培养专业人才，推动科学技术进步，对促进我国现代化建设具有重大意义。它所产生的巨大社会效益和潜在的经济效益是难以估量的。

基于这种使命感，自 1988 年起，山东科学技术出版社设“泰山科技专著出版基金”，成立科技专著评审委员会，在国内广泛征求科技专著，每年补贴出版一批经评选的科技著作。这一创举已在社会上引起了很大反响。

1992 年，在山东省委、省政府的支持下，在原“泰山科技专著出版基金”的基础上，由山东省出版总社、山东省科学技术委员会和山东科学技术出版社共同成立了“山东省泰山科技专著出版基金会”，并得到企业界的热情赞助，为资助学术专著的出版提供了更加可靠的保证。

但是，设基金补助科技专著出版毕竟是一件新生事物，也是出版事业的一项改革。它不仅需要在实践中不断总结经验，逐步予以完善；同时，也需要社会上有关方面的大力扶植，以及学术界和广大读者的热情支持。

我们希望，通过这一工作，高水平的科技专著能够及早问世，充分显示它们的价值，发挥科学技术作为生产力的作用，不断推动社会主义现代化建设的发展。愿基金会支持出版的著作如泰山一样，耸立于当代学术之林。

泰山科技专著评审委员会

1992 年 12 月

前 言

生物膜是当前分子生物学、细胞生物学十分活跃的研究领域之一。其基本任务是探讨生物膜的能量转换、信息识别与传递、物质运送和分配等基本生命现象的分子机理，并在阐明其原理的基础上，为改革与创立工、农、医高新技术和新兴企业提供扎实的基础。

生物膜是由蛋白质、脂类以及碳水化合物等组成的超分子体系。研究生物膜的结构与功能不仅需要对膜脂、膜蛋白等单一组分进行研究，更重要的还应对构成生物膜各组分之间的相互关系进行探索。膜脂是生物膜的基本骨架，膜蛋白是膜功能的主要体现者，因此膜脂-膜蛋白相互作用的研究，可以说是生物膜结构与功能研究的一个中心环节。

膜脂双分子层是生物膜的基本特征。1979年，荷兰学者 Verkleij 等提出膜脂的多型性，即生物膜的脂质除以脂双层为其基本结构外，还有六角形 I (H_I)、六角形 II (H_{II}) 等非双层脂结构。约占线粒体膜、叶绿体类囊体膜、莱氏衣原体膜等膜脂 50% 的非双层脂（如 PE, MGDG）的生理意义，及其在一定条件下转变为非双层脂结构的重要性，日益引起人们的注意。因此，研究膜脂-膜蛋白相互作用，不仅要研究双层脂，也需探索非双层脂、非双层脂结构对膜蛋白的影响。此外，双层脂结构与非双层脂结构在一定条件下是可以相互转化的，膜蛋白在这里具有什么影响也是需要注意的。

1987年，“膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用”正式列为国家自然科学基金重大项目，由中国科学院生物物理研究所、植物研究所，中国医学科学院基础医学研究所，清华大学生物科学与技术系和北京医科大学共同承担。杨福愉、黄芬为项目主持人。本项目分别从线粒体膜、支原体膜、叶绿体膜、红细胞膜及人工膜研究膜脂-膜蛋白的相互作用，并联系农业、医学实际研究植物抗冷性和细胞衰老的分子机制。具体课题包括：二价金属离子与膜脂-膜蛋白相互作用（杨福愉主持），支原体膜蛋白及膜脂分子性质的研究（黄芬主持），捕光色素蛋白在叶绿体类囊体膜上的横向迁移与膜脂关系（匡廷云主持），膜蛋白对脂多型性的影响及其生物学意义的研究（林克椿主持），老化红细胞膜脂、膜蛋白的变化及抗衰老药物的作用机制（潘华珍、赵南明、黄芬主持），膜脂-膜蛋白的相互关系与植物抗寒性的研究（简令成、匡廷云、杨福愉主持），研究膜脂与膜蛋白相互作用的近代生物物理方法（赵南明主持）。

由于选题比较明确，加之参加单位的原有基础比较雄厚，在工作中既能发挥各自原有的特色，又分工协作、取长补短，因此立项任务的完成很顺利，取得了丰硕成果。5年中发表学术论文 119 篇，其中国际刊物 37 篇，《中国科学》3 篇，《科学通报》14 篇，学报 65 篇，大大超过预定目标。同时，

还培养出青年科技人才 72 人。研究成果有的获国家或部级奖励, 有的经过专家鉴定并已推广应用。

在项目完成后, 不少同志建议将项目成果汇编成专著予以发表, 参加的同志也深感通过任务的完成不仅在学术上有较大的收获, 而且对良好的协作气氛也留下了深刻的印象, 因此也都具有编写专著的强烈愿望以志纪念。这一愿望在泰山科技专著出版基金会与山东科学技术出版社的大力支持下很快得以实现, 编写工作进展顺利。对此我们深表感谢。

本书分四个部分。第一部分(1~11 章)反映膜脂-膜蛋白相互作用基础研究的成果。这部分既包含双层脂对膜蛋白的作用, 也有非双层脂、非双层脂结构倾向性对膜蛋白影响的研究成果。此外, 对膜蛋白影响脂多型性的初步探索也作了报导。第二部分(12~14 章)反映了膜脂-膜蛋白相互作用与医学的研究结果及国际动态。第三部分(15~17 章)包括膜脂-膜蛋白相互作用与农作物抗冷性的研究成果, 这里既有筛选水稻抗冷品种生化与生物物理指标的研究结果, 也有在研究膜脂-膜蛋白相互作用基础上成功地研制水稻抗冷剂的报导。最后一部分(18~19 章)介绍与研究膜脂-膜蛋白相互作用有关的生物物理技术和方法(包括小角度 X 衍射、圆二色光谱、红外和拉曼光谱、核磁共振、激光微束技术等), 以及有关膜蛋白二维结晶化研究概况。

每一章节除反映我们自己的研究成果外, 对有关的国际动态也作些综述性的介绍。此外, 除重大项目的原有内容外, 还结合国际研究动态请有关同志撰写反映膜脂-膜蛋白研究前沿的一些章节。因此, 本书不仅记录了我国在“七五”期间“膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用”的主要成果, 而且也反映了当前国际上在这一领域的一些研究动态。我们相信这对于从事生物膜及与之相关领域的科研与教学工作者都会有一定的参考价值。

膜脂-膜蛋白相互作用的研究范围很广, 发展也很迅速。由于我们水平有限, 在本书中可能会有不少欠妥与错误之处, 敬请广大专家与读者予以批评、指正。

在本书编辑过程中, 承林克椿教授、匡廷云教授、潘华珍教授等审阅了部分章节, 生物物理研究所《生物化学与生物物理进展》编辑部陈文雯副编审在索引的编辑及本书的技术加工方面做了大量的工作, 韩学海博士在封面设计方面提出了有益的构想。在此一并表示衷心的感谢。

编 者

1995 年 9 月

内 容 提 要

膜脂—膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用，为“七五”期间国家自然科学基金资助的重大项目。由中国科学院生物物理研究所等五个单位共同承担，1991年完成。本书内容反映此研究项目的主要研究成果，内容新颖，具有重要理论意义和应用价值。

全书共分四个部分。第一部分(1~11章)反映膜脂—膜蛋白相互作用基础研究成果，既包含双层脂对膜蛋白的作用，也有非双层脂、非双层脂结构倾向性对膜蛋白影响的研究成果；同时，对膜蛋白影响脂多型性的初步探索也作了报导。第二部分(12~14章)反映了膜脂—膜蛋白相互作用与医学的研究结果及国际动态。第三部分(15~17章)包括膜脂—膜蛋白相互作用与农作物抗冷性的研究成果。最后一部分(18~19章)介绍与膜脂—膜蛋白相互作用有关的生物物理技术和方法及有关膜蛋白二维结晶化研究概况。

每一章、节除反映我们自己的研究成果外，还对有关的国际动态作了综述性介绍。本书可供从事生物膜的研究人员，高等院校及农、医部门从事生物膜教学和科研人员参考。

目 录

第一章	Mg²⁺通过影响膜脂物理状态调节线粒体 H⁺-ATP 酶的构象与活性	1
第一节	磷脂对线粒体 H ⁺ -ATP 酶的活性恢复是必需的	1
第二节	Mg ²⁺ 对重建 H ⁺ -ATP 酶脂酶体的磷脂物理状态的影响	3
第三节	Mg ²⁺ 通过影响膜脂的物理状态诱导 H ⁺ -ATP 酶呈现适合的构象	7
第四节	Mg ²⁺ 促进线粒体 H ⁺ -ATP 酶重建作用的机理	11
第五节	二价金属离子调节膜脂-膜蛋白的相互作用可能是生物体内调节膜蛋白功能的一种重要方式	13
第二章	跨膜 Ca²⁺浓度梯度与膜脂-膜蛋白的相互作用	18
第一节	细胞内 Ca ²⁺ 分布与膜脂-膜蛋白相互作用	19
第二节	跨膜 Ca ²⁺ 浓度梯度与腺苷酸环化酶活力及构象	21
第三节	跨膜 Ca ²⁺ 浓度梯度与肌质网 Ca ²⁺ -ATP 酶活力及构象	27
第四节	结语	39
第三章	Mg²⁺对叶绿体类囊体膜的结构与功能的影响	46
第一节	Mg ²⁺ 在维持类囊体膜的结构中的作用	46
第二节	Mg ²⁺ 对激发能在 PSI-PSII 之间分配的调节作用	47
第三节	Mg ²⁺ 诱导激发能在 PSII 光合单位之间的迁移	49
第四节	Mg ²⁺ 对光合电子传递的作用	50
第五节	Mg ²⁺ 诱导外周天线色素蛋白复合体在膜上的横向迁移	51
第六节	Mg ²⁺ 诱导外周天线色素蛋白复合体在膜上迁移的一些特性	52
第七节	Mg ²⁺ 在保护和维持光合膜的功能中的作用	54
第八节	结语	55
第四章	叶绿体类囊体膜脂及叶绿素蛋白的结构与功能	60
第一节	叶绿体类囊体膜的超分子结构	60
第二节	叶绿体类囊体膜脂种类以及在不同膜区的分布	61
第三节	叶绿体类囊体膜上叶绿素蛋白复合体的种类及其在膜上的分布	65
第四节	叶绿体类囊体膜脂与叶绿素蛋白的相互作用	74
第五章	支原体膜脂及膜蛋白的分子性质	87
第一节	莱氏衣原体膜脂及膜上 Mg ²⁺ -ATP 酶分子性质的研究	87
第二节	猪肺炎支原体膜脂及膜蛋白与致病性的关系	99
第六章	膜脂多型性的研究现状	110
第一节	膜脂多型性的类型与产生条件	111
第二节	研究脂多型性的技术	117
第三节	膜蛋白对脂多型性的影响	127
第四节	膜脂多型性的生物学意义	132
第七章	非双层结构形成的倾向性调节线粒体还原型辅酶 Q-细胞色素 c 还原酶和 H⁺-ATP 酶的活性	138
第一节	影响非双层结构倾向性的因素	139
第二节	非双层结构与非双层结构倾向性	142

第三节	非双层结构倾向性的生理意义	143
第四节	非双层结构倾向性与线粒体 H^+ -ATP 酶或还原型辅酶 Q-细胞色素 c 还原酶的活性	144
第八章	配体和受体相互作用与脂的多型性	156
第一节	配体与受体、配体与脂的相互作用	156
第二节	重组膜中配体和受体相互作用与膜脂的多型性	160
第三节	天然膜中配体和受体相互作用与膜脂的多型性	163
第九章	生物膜脂质交叉双层结构与生理功能	172
第一节	膜脂质交叉双层结构	172
第二节	影响膜脂形成交叉双层结构的因素	177
第三节	膜脂交叉双层结构对生物膜理化性质的影响	180
第四节	膜脂交叉双层结构对膜蛋白生理功能的影响	181
第十章	脱血红素细胞色素 c 与线粒体蛋白质的运输	187
第一节	线粒体的结构	187
第二节	蛋白质跨线粒体膜的转运	189
第三节	脱血红素细胞色素 c 的跨膜转运	194
第四节	细胞色素 c 的折叠与“molten globule”态	197
第五节	脱血红素细胞色素 c 的折叠状态与其跨膜转运的相关性	200
第十一章	红细胞老化过程中膜脂、膜蛋白的变化	221
第一节	老化红细胞的分离	221
第二节	老化红细胞的理化性质	222
第三节	红细胞老化的机制	229
第四节	老化红细胞膜表面变化与消亡	233
第十二章	红细胞膜骨架蛋白与溶血病	239
第一节	红细胞骨架蛋白的组分	239
第二节	骨架蛋白的组装	240
第三节	遗传性球形红细胞增多症 (hereditary spherocytosis, HS) 红细胞膜病变	242
第四节	遗传性椭圆形红细胞增多症 (hereditary elliptocytosis, HE) 红细胞膜病变	245
第五节	遗传性卵圆形红细胞增多症 (hereditary ovalocytosis) 膜蛋白的缺陷	246
第十三章	含脂膜蛋白与疾病	250
第一节	棕榈酸结合蛋白	250
第二节	豆蔻酸结合蛋白	252
第三节	异戊二烯类的结合蛋白	255
第四节	糖肌醇磷脂结合蛋白	258
第五节	糖肌醇磷脂结合蛋白与疾病	265
第十四章	PE 脂质体及其在靶向药物释放基因转移及免疫分析中的应用	274
第一节	PE 的物理化学性质	274
第二节	PE 脂质体	276
第三节	PE 脂质体在药物靶向释放中的应用	278
第十五章	用体内叶绿素荧光诱导动力学鉴定水稻的抗冷性*	289

第一节	鉴定方法提出的背景·····	289
第二节	体内叶绿素 a 荧光诱导动力学的原理·····	290
第三节	材料与方法·····	291
第四节	结果与讨论·····	292
第五节	结语·····	297
第十六章	低温影响线粒体膜与水稻抗冷性鉴定方法的探索·····	300
第一节	抗冷与不抗冷玉米经低温处理后线粒体膜结构与功能的变化·····	301
第二节	抗冷与不抗冷水稻经低温处理后线粒体膜结构与功能的变化·····	303
第三节	抗冷与不抗冷水稻线粒体膜脂流动性的比较·····	305
第四节	不同抗冷性水稻品种幼芽低温处理后 ATP 含量的变化 ·····	308
第十七章	从低温逆境中膜脂-膜蛋白相互作用的研究到抗寒剂的研制·····	317
第一节	细胞膜系统的冷稳定性与植物抗寒性密切关系的揭示与证实·····	317
第二节	研究膜冷稳定性的分子机制的不同实验结果及观点·····	321
第三节	膜脂-膜蛋白的相互作用与膜冷稳定性的关系·····	323
第四节	从筛选的稳定膜的物质中研制抗寒剂·····	326
第五节	抗寒剂作用机理的进一步分析: 对稳定膜脂和膜蛋白相互 关系的作用·····	329
第十八章	研究膜脂、膜蛋白的生物物理方法·····	343
第一节	小角 X 射线衍射及中子衍射 ·····	345
第二节	圆二色光谱·····	352
第三节	红外和拉曼光谱·····	359
第四节	核磁共振·····	367
第五节	激光微束技术及其在基因转移研究中的应用·····	378
第十九章	膜蛋白的二维结晶化·····	391
第一节	膜蛋白晶体的类型·····	391
第二节	膜蛋白的二维结晶化·····	394
第三节	膜蛋白二维晶体形成的机制及条件·····	397
第四节	电镜观察及三维重构电镜·····	400
名词索引	·····	404

第一章 Mg^{2+} 通过影响膜脂物理状态调节线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的构象与活性

生物膜是由蛋白质、脂质和碳水化合物等构成的超分子体系，生物膜的主要功能是能量转换、物质运送和信息传递。膜脂是生物膜的基本骨架，膜蛋白是膜功能的主要执行者。膜脂-膜蛋白的相互作用是生物膜研究的中心环节，它对于阐明生物膜的结构与功能的相互关系具有重要的作用和理论意义。

膜蛋白（包括膜结合酶）是与膜脂紧密结合的。为了研究膜蛋白的功能，需要将其从膜上分离和纯化，因使其脱离膜脂的天然环境，会导致膜蛋白功能的丧失。自 70 年代以来，广泛采用了一种新的生物膜研究技术，即将分离、纯化的膜蛋白又重新嵌入由磷脂构成的人工膜即脂质体微囊中，使其恢复原来的功能或酶的活性，以研究膜脂-膜蛋白的相互作用即所谓生物膜的重建。

近年来，很多实验室^[1~3]都试图将不同的膜蛋白在脂质体上实现重建，但是重建酶的活性往往较低，重建效率不高，而且实验的重复性差。线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶是生物膜能量转换过程中的一个重要的“装置”，分布于线粒体内膜上， $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的结构与功能的研究，对于阐明生物膜的能量储存、转换和利用等具有重要的作用。我们实验室曾用超声、胆酸盐稀释和胆酸盐透析等三种方法对猪心线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶在脂质体上的重建效果进行了比较研究^[4]。在实验的探索过程中发现，当用胆酸盐透析法将猪心线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶在大豆磷脂脂质体上重建过程中，如果透析介质中加入 1mmol/L Mg^{2+} ，能显著增加重建 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性，而且重建的成功率高，重复性很好。这提示， Mg^{2+} 对线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的重建起着重要的作用。因此，我们对 Mg^{2+} 影响重建脂酶体的脂的物理状态与重建酶的蛋白构象和活性的相关性进行了较系统而深入的研究，所得实验结果，对于阐明 Mg^{2+} 的作用机理，深入研究二价金属离子与膜脂-膜蛋白的相互作用提供了很好的实验例证，对进一步探讨和阐明生物膜研究中的一些基础理论问题具有重要的意义。

第一节 磷脂对线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性恢复是必需的

一、线粒体 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的结构组成

线粒体是由外膜、内膜和基质所组成的细胞内的一个重要的细胞器。线粒体的内膜又主要由定位于膜上的催化电子传递的酶系和 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶所组成。 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶由位

于水相的催化中心 F_1 、嵌入膜脂双层的疏水部分 F_0 和连接二者的赋予寡霉素敏感蛋白 (oligomycin sensitivity-conferring protein, OSCP) 等所组成^[5] (图 1-1)。 F_1 是酶的活性中心, F_0 是质子通道, OSCP 对表现该酶的专一性抑制剂如寡霉素 (oligomycin) 和二环己基碳二亚胺 (N, N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) 的敏感性是必需的。大量的实验表明, 分离的 F_1 虽具有水解 ATP 的酶的活性但不表现对该酶的抑制剂的敏感性, 只有膜结合形式的 F_1 (即 F_0 - F_1 - ATP 酶) 才表现对抑制剂敏感的特性。因此, 可以根据酶对抑制剂的敏感性来检验 H^+ - ATP 酶的重建是否成功。从 H^+ - ATP 酶的结构可推测, 在从线粒体内膜上分离和提纯此酶后, 由于膜脂的丢失必然影响纯化酶的活性, 而加入一定的磷脂又可能使其活性得到恢复, 因此, 可以推测膜脂的组成和物理状态必然会影响 H^+ - ATP 酶的活性与构象, 对其功能的表现起着重要的作用。

二、磷脂对线粒体 H^+ - ATP 酶活性的影响

将纯化的猪心线粒体 H^+ - ATP 酶, 用胆酸盐透析法在由不同磷脂组分组成的脂质体上重建, 测定重建脂酶体的水解活力。实验结果表明^[6], H^+ - ATP 酶去脂后 (即去脂 H^+ - ATP 酶) 其活性基本丧失; 当加入各种磷脂后, 活性可以不同程度地恢复。比如用极性“头部”不同的 7 种磷脂恢复去脂 H^+ - ATP 酶的酶活, 其顺序为 L- α -磷脂酰-L-丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) > 双磷脂酰甘油 (diphosphatidylglycerol, DPG) > L- α -磷脂酰-DL-甘油 (phosphatidylglycerol, PG) > 磷脂酸 (phosphatic acid, PA) > 磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) > 磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) > 磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)。而用脂肪酰侧链不同的 5 种 PC 对 H^+ - ATP 酶活性恢复的比较结果表明, 二油酰-L- α -卵磷脂 (dioleoyl phosphatidylcholine, DOPC) > 二硬脂酰卵磷脂 (distearoyl phosphatidylcholine, DSPC) > 二棕榈酰-L- α -卵磷脂 (dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC) > 二肉豆蔻酰-L- α -卵磷脂 (dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPC) > 双月桂酰卵磷脂 (dilauroyl phosphatidylcholine, DLPC)。这些结果表明, 无论磷脂的极性“头部”还是脂肪酰侧链的组分都具有恢复去脂 H^+ - ATP 酶活性的作用。同时, 实验结果还表明, 溶血卵磷脂也可使酶活明显恢复, 其中含不饱和键的单油酰-L- α 卵磷脂 [oleoyl lysophosphatidylcholine, L(0) PC] 的作用尤为明显。用 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯 (diphenylhexatriene, DPH) 荧光探针测试重建 H^+ - ATP 酶脂酶体的膜

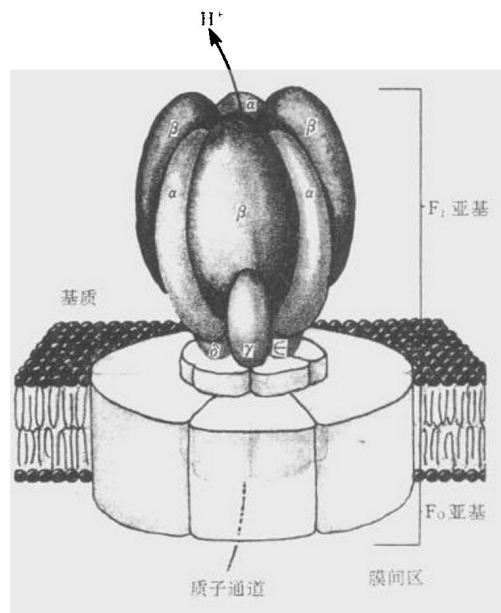


图 1-1 线粒体 ATP 合成酶的结构

图示嵌入脂双层的质子 (H^+) 通道 F_0 部分; 面向基质的由 3α , 3β 和 γ , δ 以及 ϵ 亚基组成的具有催化活性的 F_1 部分; 连接 F_0 与 F_1 的部分是致寡霉素敏感蛋白 (OSCP)

脂流动性的结果表明, 合适的磷脂组分可使脂双层具有适度的流动性, 这对维持 $H^+ - ATP$ 酶具有较适合的构象, 从而表现较高的酶活性可能是很重要的。

第二节 Mg^{2+} 对重建 $H^+ - ATP$ 酶脂酶体的
磷脂物理状态的影响

一、 Mg^{2+} 促进线粒体 $H^+ - ATP$ 酶在脂质体的重建

我们在将猪心线粒体 $H^+ - ATP$ 酶在大豆磷脂脂质体上重建过程的研究中, 开始时重建的成功率很低, 即使有时重建成功, 实验的重复性也很差。后来在探索重建最适条件中, 发现 Mg^{2+} 对建立一个重组效率高、重复性好的实验体系起着关键作用。实验结果表明, 在用胆酸盐透析法将猪心线粒体 $H^+ - ATP$ 酶在脂质体重建过程中, 透析介质中 $1mmol/L Mg^{2+}$ 的存在, 明显提高重建 $H^+ - ATP$ 酶的活性, 如 $^{32}P_i - ATP$ 交换、水解活性及其对抑制剂寡霉素和 DCCD 的敏感性 (表 1-1)^[7-10], 以及 ATP 驱动的跨膜电位 ($\Delta\psi$) 等^[11] (图 1-2)。这些实验结果表明, Mg^{2+} 对重建线粒体 $H^+ - ATP$ 酶表现高的酶活性具有明显的促进作用。

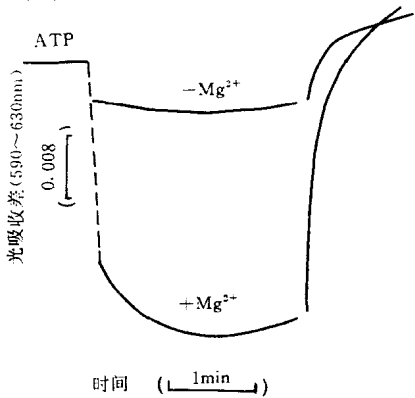


图 1-2 Mg^{2+} 对重建 $H^+ - ATP$ 酶由 ATP 驱动的膜电位 ($\Delta\psi$) 变化的影响

表 1-1 在无 Mg^{2+} 与有 Mg^{2+} 存在条件下重建的 $H^+ - ATP$ 酶的酶活

脂酶体	$^{32}P_i - ATP$ 交换活力		ATP 水解活力及其对抑制剂的敏感性					
	活 力	增加 (%)	活 力	增加 (%)	oligomycin		DCCD	
					活力	抑制 (%)	活力	抑制 (%)
- Mg^{2+}	0.003	—	1.23	—	0.84	32	1.06	14
+ Mg^{2+}	0.021	600	1.89	54	0.61	68	1.60	16

注: 测定酶活对抑制剂敏感性时, 在反应系统中加入 $0.8\mu g$ 寡霉素或 $0.4\mu g$ DCCD;
比活定义为: $\mu mol Pi / mg$ 蛋白 $\cdot min$; 数据是 5 次实验的平均值。

二、 Mg^{2+} 通过改变膜脂的物理状态调节重建 $H^+ - ATP$ 酶的活性

Mg^{2+} 何以对线粒体 $H^+ - ATP$ 酶的重建具有促进作用, 推测有以下几种可能性: Mg^{2+} 直接作用于 $H^+ - ATP$ 酶; Mg^{2+} 有助于防止 ATP 酶的可溶性部分 F_1 从酶复合体上脱落; Mg^{2+} 通过改变膜脂的物理状态从而间接影响酶蛋白的构象与活性。大量的实验结果表明, Mg^{2+} 的影响主要是一种间接作用, 即通过调节重建脂酶体的脂质分子具有适合的流动性, 从而有利于重建 $H^+ - ATP$ 酶表现高的酶活性。主要实验证据如下:

1. Mg^{2+} 诱导重建 $H^+ - ATP$ 酶脂酶体的脂质分子具有较适合的流动性

膜脂是生物膜的基本骨架, 镶嵌于脂双层中的膜蛋白的功能会受膜脂的组成和物理状态的影响。 Mg^{2+} 对线粒体 $H^+ - ATP$ 酶的明显促进作用, 可能与其影响脂酶体的磷脂分子的物理状态相关。为此, 我们用荧光探针、自旋标记等方法对有、无 Mg^{2+} 条件下重建的 $H^+ - ATP$ 酶脂酶体中磷脂的有序性或流动性进行了测试和比较。当用荧光探针 7AS, 12AS, 16AP [7, 12- (9 蒎酰) 硬脂酸, 16- (9 蒎酰) 棕榈酸]^[12], 芘激发二聚体形成效率 (pyrene excimer formation efficiency)^[13, 14], 部花菁昔 540 (merocyanine 540, MC 540)^[15], 以及用自旋标记物 5, 12, 16-氮氧基硬脂酸 [5, 12, 16- (N-oxyl) -4', 4'-dimethylloxazolidine derivatives of stearic acid, 5NS, 12NS and 16NS] 等^[16] 对有、无 Mg^{2+} 条件下形成的脂酶体 [$L \cdot (H^+ - ATP \text{ 酶})$] 的脂质的流动性测试结果均表明, Mg^{2+} 对重建脂酶体中靠近脂双层表层的脂质分子的流动性有明显的影响, 而对靠近深层的脂质分子的流动性基本上无影响。如图 1-3 所示, 从 MC540 与 2-AP 之间的能量转移发射光谱可以看出, 含 Mg^{2+} 的脂酶体在 585nm 处的转移峰高较无 Mg^{2+} 者明显增强, 前者的能量转移效率为 0.85, 而后者为 0.59, 二者存在明显差异,

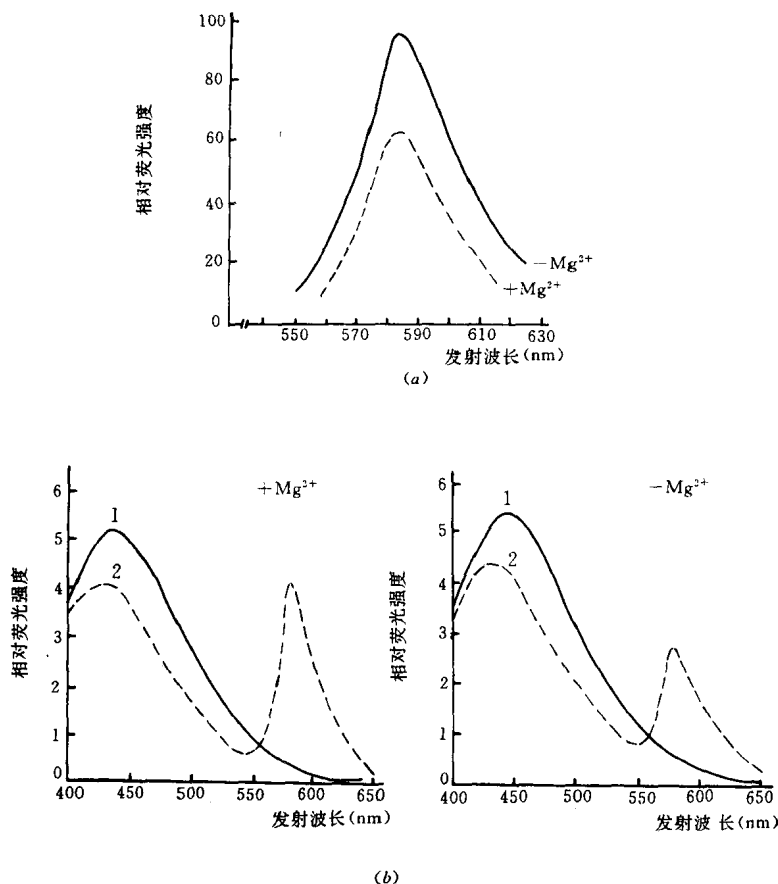


图 1-3 重建 $H^+ - ATP$ 酶脂酶体的 MC540 的荧光测量

(a) 含 Mg^{2+} 与不含 Mg^{2+} 的 $H^+ - ATP$ 酶脂酶体的 MC540 的荧光发射光谱 (b) 在 2-AP 与 MC 540 之间的能量转移, 曲线 1 MC540 ($5.4 \mu\text{mol/L}$), 2 MC540 + 2-AP ($1.28 \mu\text{mol/L}$)