

Mg²⁺ 对 H⁺-ATP 酶在脂质体重组的影响

杨福愉 郭倍奇 黄有国 车延武

(中国科学院生物物理研究所)

近年来,研究生物膜蛋白(包括酶)的结构与功能经常采用拆离与重组的手段,但这种方法往往活性较低,重复率也不高。因此摸索一个合适的重组条件是很重要的。

Razin^[1] 等曾报道 Mg²⁺ 有助于生物膜的重组, Kagawa^[2] 则提到 Mg²⁺ 对细菌光合膜重组后表现光化磷酸化是重要的,但对线粒体膜的重组则并不需要。我们发现, Mg²⁺ 对猪心线粒体的 H⁺-ATPase 在脂质体上的重组确有明显的作用。

我们实验室曾用几种方法(胆酸盐透析、胆酸盐稀释和超声法)对猪心线粒体 H⁺-ATP 酶在脂质体上重组进行过比较^[3]。本文报道用胆酸盐透析法将 H⁺-ATP 酶进行重组过程中, Mg²⁺ 能显著地增加重组后酶的活性 (³²Pi-ATP 交换、酶活性和对寡霉素或 DCCD* 的敏感性以及加入 ATP 后 ANS 荧光强度的变化),而且重组的重复性也比较好。

实验材料和方法除透析介质中加入 0—5mM MgCl₂ 外,其它详见文献[3]所述。当重组时,先将 H⁺-ATP 酶复合体的 F₀ 部分嵌入脂质体 (LF₀),然后再加入 F₁ 形成 LF₀+F₁,并进行活力测定。

实验结果表明,用胆酸盐透析法进行重组过程中,如果透析液中加入一定量的 Mg²⁺,能明显提高重组的 H⁺-ATP 酶的 ³²Pi-ATP 交换活力。从图 1 (系五次实验平均值)中可以看出,重组体系中的 Mg²⁺ 能使形成的 LF₀ 的交换活力增高 7 倍左右。当 F₁ 与 LF₀ 结合后再测定时,亦得到相似的结果。

H⁺-ATP 酶的可溶性部分 (F₁) 具有对寡霉素或二环己基碳二亚胺 (DCCD) 不敏感的特性,但一旦它与

H⁺-ATP 酶其它组份共同结合在膜上时,就表现对上述二种抑制剂敏感的特性。因此, H⁺-ATP 酶活性对寡霉素或 DCCD 敏感性的大小也是反映该酶重组程度的一个指标。从表 1 中可以看出,在重组过程中, Mg²⁺ 的存在,能使重组酶的水解活性增加约 50% 左右 (LF₀) 和 30% 左右 (LF₀+F₁),同时对寡霉素的敏感性明显增加,达 220% 左右 (LF₀) 和 110% 左右 (LF₀+F₁)。对 DCCD 的敏感性增加达 70% 左右 (LF₀) 和 50% 左右 (LF₀+F₁),但不如寡霉

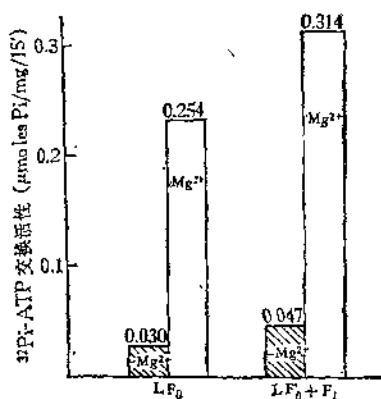


图 1 Mg²⁺ 对猪心线粒体 H⁺-ATP 酶在脂质体重组的影响——对 ³²Pi-ATP 交换活性的影响

用下述方法测定交换: LF₀ (大约 400 微克蛋白) 在 30℃ 于 1 毫升含 20μmoles Tris-HCl pH 8 缓冲溶液, 50μmoles KCl, 10μmoles MgCl₂, 2.5mg 牛血清蛋白, 10μmoles ATP · Na 和 ³²Pi 的溶液中保温 15 分钟。F₁ (大约 40 微克蛋白) 和 LF₀ 在 30℃ 预保温 10 分钟, 然后用上述系统测其交换活力。数据是五次实验结果的平均值

本文 1979 年 10 月 22 日收到。

* 本文所用缩写如下: ANS——1-苯胺-8-萘磺酸; DCCD——二环己基碳二亚胺。