




细胞生物学进展

(第三卷)

郑国锴 翟中和 主编

ADVANCES IN CELL BIOLOGY

Vol. 3. 1993



高等教育出版社

Q78
860

细胞生物学进展

第 三 卷

郑国锴 翟中和 主编

高等教育出版社

(京) 112号

细胞生物学进展

第三卷

郑国锴 翟中和 主编

*

高等教育出版社出版

新华书店总店科技发行所发行

北京印刷一厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 19.5 插页 1 字数 460 000

1994 年10月第1版 1994 年11月第1次印刷

印数 0001—1, 035

ISBN7-04-004873-6/Q·223

定价 20.15 元

《细胞生物学进展》编辑委员会

(以姓氏笔划为序)

顾 问	庄孝德	陈阅增	汪堃仁	汪德耀
	罗士韦	施履吉	姚 鑫	
主 编	郑国锷	翟中和		
编 委	王亚辉	王永潮	刘树森	许智宏
	吴 旻	李宝健	李靖炎	周 嫦
杨福愉	郝 水	曾弥白		
秘 书	丁明孝	何大澄	谷祝平	李茂国

本卷作者

(以文章出现先后为序)

杨福愉 吴乃虎 朴英杰 郑国锷 陈建国 翟中和
张 博 郝 水 汪国顺 潘惟钧 周 嫦 杨弘远
贾敬芬 吴祖泽 张传茂

编写说明

《细胞生物学进展》第一、二卷出版以后，普遍反映较好，是一部受到细胞生物学工作者与研究生欢迎的参考书，有的学校把它定为研究生的教学用书或必读参考书。为了使本书在教学方面能起到更多的作用，本书的第三卷内容除重视新的进展性知识外，较多地考虑到细胞生物学知识的系统性与全面性。为此聘请国内一些知名专家，根据他们的专业与擅长，撰写了内容丰富的专题，与第一、二卷起到互补作用，使细胞生物学进展一、二、三卷构成一个完整体系，尤其是在细胞结构与功能方面更臻完善。

主 编

目 录

线粒体.....	1
高等植物叶绿体细胞分子生物学	28
溶酶体	64
核糖体的结构与功能	98
中等纤维分子生物学.....	116
核孔复合体的研究进展.....	144
核仁的结构与功能研究进展——rRNA 基因高效转录的机理.....	177
染色体端粒.....	187
植物性细胞操作研究的进展.....	201
植物体细胞杂交研究进展.....	223
血细胞的生成与调控.....	263
非细胞体系核重建研究的进展.....	283

线粒体

杨福愉

中国科学院生物物理所生物大分子国家重点实验室

1. 前言	1
2. 线粒体的结构	2
3. 线粒体与能量转换	3
3.1 电子传递链（呼吸链）的组分	4
3.2 合成能源物质 ATP 的关键装置——ATP 合酶	7
3.3 氧化磷酸化的耦联机制	9
4. 线粒体的生物合成（biogenesis）	17
4.1 线粒体 DNA（mtDNA）的结构、功能和差异	17
4.2 线粒体蛋白质的跨膜运送	20
5. 线粒体与衰老、疾病	24
6. 线粒体与植物抗冷性	26

1. 前 言

线粒体是细胞的一个重要细胞器。它通过呼吸作用为细胞各项活动提供能量，有细胞“动力站”之称。生物摄取的食物通过代谢分解形成小分子产物，之后它们被输送至线粒体，经过氧化作用将其中贮存的能量逐步释放出来，并转化为 ATP 以供各种活动的需要，因而它也可称为化学能→化学能的能量转换器。除个别例外，真核细胞中普遍含有线粒体。

线粒体是 1898 年 Benda 首先命名的。mitochondrion 来源于希腊字（mito：线，chondrion：颗粒）。在线粒体命名之前，1850—1890 年期间已经有不少科学工作者在显微镜下观察到动物细胞内含有这种形态的结构。1890 年德国 Altmann 认为：细胞中这种颗粒与细菌很相似，可能是共生于细胞内能独立自主生活的有机体。他称之为的“基本的活颗粒”（bioblast）。但当时这一假说并没有引起注意，更没有被大家所接受。在 1904 年 Meres 在植物细胞中也看到了线粒体。

由于技术方法的限制，线粒体研究在很长时间内仅仅停留在形态观察上，无法对其结构和功能进行细致的研究。1934 年 Bensley 和 Hoerr 企图从肝组织中分离线粒体，但没有获得成功。1940 年 Claude 改进了分离方法。1948 年经 Hogeboom, Schneider, Palade 等人进一步努力才比较成熟地建立了用分步离心来分离线粒体的方法，从此线粒体的生化研究才逐步开展起来。开始仅对线粒体的脂肪酸氧化和三羧酸循环进行了研究，1950 年前后才扩展到电子传递和氧化磷

酸化方面。1952—1953年美国 Palade 和瑞典的 Sjostrand 各自利用电镜超薄切片技术观察到线粒体的精细结构。从此线粒体结构与功能的研究进入到一个新的阶段，两者相互配合，相互促进使这方面的工作得到迅速的发展。

1963—1964年又确定线粒体内有DNA存在，以后继续发现它还具有自我繁殖所需的基本组分（包括DNA、DNA聚合酶、RNA聚合酶、核糖体、转移RNA，氨基酸活化酶等）。这样，线粒体的研究又增加了新的内容。70年代以来线粒体自主性和生物发生的研究一直非常活跃。与此同时，早在19世纪后期，Altmann提出的“内共生的假说”又重新流行起来。

人、酵母线粒体DNA一级结构的序列分析已经完成，表明它们所编码的线粒体13种多肽、rRNA以及t-RNA的基因图谱也已基本搞清楚。

线粒体虽然内含DNA以及转录、转译酶系，但其自主性却非常有限。迄今所知，线粒体DNA仅编码13种多肽并在线粒体核糖体进行合成，换言之，绝大部分线粒体蛋白质是由核DNA编码并在细胞质核糖体合成的。合成之后再定向运送至线粒体并跨越外、内膜而选择分送至各部位。蛋白质跨线粒体膜运送是当前十分活跃的研究领域之一。

从线粒体正式命名到现在还不到100年，由于生化研究与电镜技术（如负染、冰蚀等）的不断改进与创新，线粒体结构与功能的研究一直发展很快，近年来随着分子生物学，尤其是生物膜、生物能学和分子遗传学的发展，使具有精细结构、多样功能的线粒体的研究更加广泛、更加深入。

线粒体的研究不仅具有理论上的意义，而且在实际应用方面也日益引起人们的注意。近年来对线粒体与植物抗性、线粒体与疾病（肌肉病，克山病，肿瘤等）和衰老也开展了不少研究。线粒体的研究范围甚广，本文不拟作全面论述，下面仅就线粒体的结构、能量转换、生物合成以及线粒体与衰老、疾病等方面的概况及某些进展作一简要的介绍。

2. 线粒体的结构

在光学显微镜下线粒体呈很小的球状、棒状或细丝状。通过电镜观察可以显示线粒体的精细结构。线粒体由内、外两层膜组成，内膜向线粒体的中心腔内陷形成嵴。图1是线粒体的模式图。

线粒体一般直径为0.5—1.0 μm ，长3 μm 左右。但有的线粒体较大，直径为2—3 μm 。最大的可达7 μm 。这种线粒体称为“巨大线粒体”。

每个细胞内线粒体的数量也有很大的差异。最少的每个细胞只含1个线粒体（如鞭毛藻，*Chromuline pusilla*），最多的可达300 000（卵母细胞中）。大鼠肝细胞平均有800个（500—1 400）线粒体。植物细胞线粒体含量一般比动物细胞要少。

从内部结构来看，各种细胞的线粒体也存在着很大的变异性。大多数细胞线粒体内膜内折形成片状的嵴，它们与线粒体的长轴相垂直，但也可观察到与长轴相平行的嵴。嵴可以是单条的，也可以分支而形成复杂的网状。有的还可以观察到同心圆型的嵴（大鼠软上颚肌线粒体）。

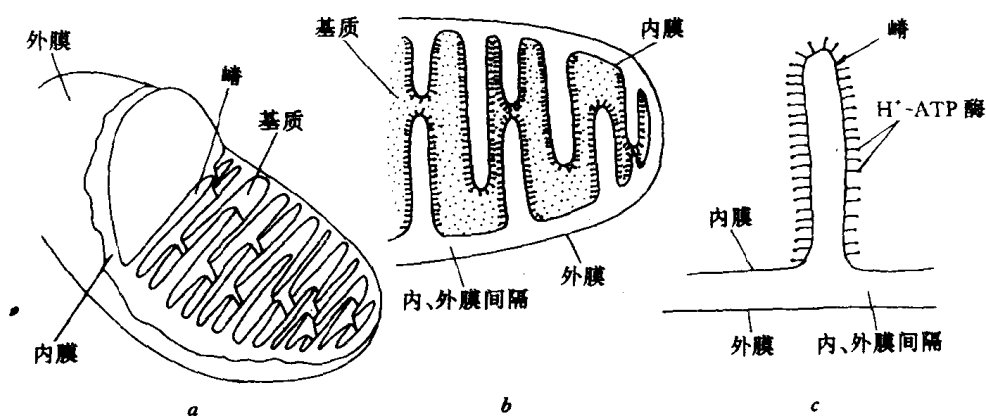


图 1 线粒体的模式图

a. 立体模式；b. 横截面图；c. 嵴放大示意图

线粒体内膜的内折可以管状来替代片状，这在植物细胞比较普遍。变形虫 (*Chaos chaos*) 的线粒体的嵴不仅呈管状，而且组成网状与波形相结合的复杂结构。

嵴的数目也可能有很大的差异。有的线粒体内部充满着嵴 (如蝙蝠甲环肌线粒体)，有的则很稀少 (如肝细胞线粒体)。一般能量需要较多的细胞，线粒体数量较多，其内部结构亦比较复杂，反之，线粒体数量较少，嵴的数量亦不多。

同一类细胞在不同生理条件下线粒体也会发生明显的变化，例如，在冬眠末期蝙蝠褐脂肪组织的线粒体不仅数量多，而且嵴的密度亦大，以满足苏醒后加强活动的需要。

在机体发育和分化过程中，线粒体的变化亦是很显著的。如蝗虫 (*Locusta migratoria*) 的飞翔肌在变态过程中线粒体数量大幅度增加，蜕皮前 8 天线粒体只占肌细胞的 6%。蜕皮后增至 30%。在此期间，肌细胞亦增长 10 倍。因此实际上线粒体增加了 50 倍。

3. 线粒体与能量转换

一切异养生物的能量都来自食物。食物通过一系列的降解转化，最后经过生物氧化把内含的能量转换为可利用的形式加以贮存或供各种活动的需要。生物氧化所释放的能量主要在有氧呼吸阶段。以葡萄糖为例，无氧酵解过程只形成 2 个分子 ATP，而葡萄糖的全部氧化成 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 的全过程共形成 36 个分子 ATP，因此，绝大部分的 ATP 是在有氧氧化过程中产生的。生物化学、细胞化学结合电子显微镜以及免疫反应等研究结果表明，催化三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸分解等有关酶系，以及线粒体的 DNA、RNA、核糖体等都分布在基质中。外膜在组分和酶的分布方面与内膜比较都有很大的差异。外膜含有的酶或酶系较少，有些可能与磷脂代谢有关。内膜中蛋白质含量很丰富，脱氢酶类、电子传递链、 H^+ -ATP 酶复合体以及一些运载体蛋白 (如 ADP-ATP 载体，三羧酸载体，二羧酸载体， Ca^{2+} 载体，L-谷氨酸载体等) 都位于内膜上 (估计共约 60 种蛋白质)。综上所述，从能量转换来考虑，线粒体内膜显然起着主要

作用。

3.1 电子传递链（呼吸链）的组分

呼吸链的组分及其序列经长期、大量科学实践的积累，基本看法逐渐趋于一致，它们主要由下列几类分子组成：(1) 吡啶-核苷酸连接的脱氢酶，(2) 黄素蛋白，(3) 铁硫蛋白（或称铁硫中心，FeS），(4) 辅酶 Q，(5) 细胞色素（可分 a, b, c 三类）。

美国 Green 等实验室首先将呼吸链拆离成 4 个功能复合体（I—IV）以及辅酶 Q 和细胞色素 c。在一定条件下，4 个复合体可以按 1:1:1:1 的比例将它们重组并基本上恢复原有活力。这些复合体可分别催化以下反应：

- I. NADH 氧化—辅酶 Q 还原（NADH-辅酶 Q 氧化还原酶，又称 NADH 脱氢酶）。
- II. 琥珀酸氧化—辅酶 Q 还原（琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶，又称琥珀酸脱氢酶）。
- III. 还原的辅酶 Q 氧化—细胞色素 c 还原（辅酶 Q-细胞色素 c 还原酶）。
- IV. 细胞色素 c 氧化-O₂ 还原（细胞色素 c 氧化酶）。

由此可以看出，辅酶 Q 能在复合体 I 与 III 和 II 与 III 之间传递着还原当量，细胞色素 c 则在 III 与 IV 之间传递着还原当量。

70 年代，在综合已有科研成果的基础上，对线粒体呼吸链的组分及其序列提出如图 2 所示的假设：

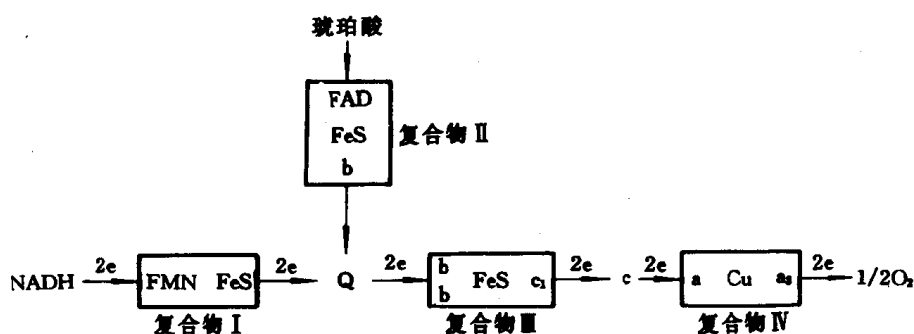


图 2 电子传递链的组分及其序列

FMN: 异咯嗪单核苷酸; FND: 异咯嗪腺嘌呤二核苷酸;

FeS: 铁硫中心; b、c、c₁: 细胞色素 b、c、c₁;

Q: 辅酶 Q

从此以后的十余年，这方面的研究不断深入，尤其在每一复合物的组分及其在线粒体内膜上的定位分布获得了不少新的信息。下面将分别予以叙述：

3.1.1 复合体 I

复合体 I 催化 2 个电子从 NADH 传递至辅酶 Q (CoQ)。它是呼吸链中最复杂的酶系。除去

很多亚单位外还含有 FMN 以及至少 6 个铁硫中心的辅基。纯化酶的分子量为 700 000—850 000/FMN。据认为,复合体 I 在线粒体内膜以二聚体存在。Heron 等通过等电聚焦与不连续 SDS 凝胶电泳相结合可将复合体 I 分成 26 个多肽。也有人应用 chaotropic agents 将此复合体分解成 3 部分:(1) 水溶性黄素蛋白,(2) 水溶性铁硫蛋白,(3) 不溶于水的部分,它含有磷脂,低含量铁以及对酸不稳定的硫。

(1) 水溶性黄素蛋白 这部分含有 3 个等比的亚单位,分子量分别为 51 000, 24 000 和 9 000。第 1 个亚单位或第 2 与第 3 亚单位均含有 1 个铁硫中心。

(2) 水溶性铁硫蛋白 这部分约占复合体 I 的 20%。它含有分子量分别为 75 000, 49 000, 80 000, 18 000, 15 000 以及 13 000 的几种亚单位,应用去垢剂与硫酸铵分级沉淀可将这部分分成两组分各自含有铁硫中心。

(3) 不溶于水的部分 含有 15 个多肽,分子量在 16 000—20 000 之间。已经肯定有 2 个铁硫中心,二铁型与四铁型各占 1 个,这一部分内含的多肽的等电点较高,很可能它们与膜脂双层的相互作用除疏水力外还包括与带电荷的磷酸基团之间的静电作用。

通过疏水与亲水的标记试剂的测试结果提出复合体 I 各组分在线粒体内膜上定位分布的示意图(见图 3)。从图中可见,水溶性的黄素蛋白和铁硫蛋白部分位于中间,不直接与脂双层相接触,而疏水的亚单位则围在四周形成外壳。复合体 I 催化 2 个电子从 NADH 传递至辅酶 Q。与此同时,也发生质子的定向转移。因此,它也是一个质子移位体。

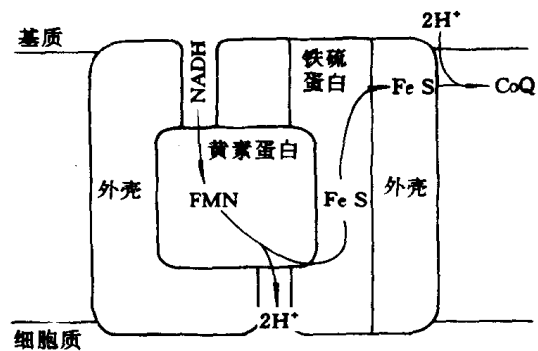


图 3 复合体 I 各部分在线粒体内膜上的定位分布示意图

3.1.2 复合体 II

复合体 II 催化电子从琥珀酸传递至 CoQ,它仅仅是电子传递体而不是质子转移体。这个复合体由 4 个多肽组成。两个较大的多肽组成琥珀酸脱氢酶,其中 1 个较大的多肽含有 1 个共价结合的 FAD 以及两个铁硫中心。复合体 II 含有等摩尔数的细胞色素 b 与 FAD。这里的细胞色素 b 与复合体 III 中的不同,它的功能尚不清楚,有待进一步研究。

3.1.3 复合体 III

复合体 III 催化 CoQ 的氧化和细胞色素 c 的还原,故又称 CoQ-细胞色素 c 还原酶。在这一酶促的氧化还原过程中也发生质子的跨膜运送,因而复合体 III 也是一个质子移位体。这一复合体已从牛心、牛肝和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的线粒体中纯化。它们的组成很相似,均含有 8—10 个多肽,每一多肽的分子量在 5 000—50 000 之间。

复合体 III 的基本单位(单体)含有如下的辅基:2 个细胞色素 b,1 个细胞色素 c₁,一个两铁型的铁硫中心(它与分子量为 27 000 的 rieske 蛋白结合在一起)。免疫反应显示,这个铁硫中

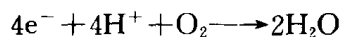
心不同于复合体 I 中的铁硫中心。超离心等实验结果表明, 纯化的复合体 III 的分子量二倍于基本单位, 故推断线粒体内膜的复合体 III 系以二聚体形式存在, 分子量为 550 000。除细胞色素 b、c₁ 以及铁硫中心外, 复合体 III 中还有几种蛋白质, 它们不具有氧化还原功能, 但可能参与质子移位或具有其它作用。至于两个细胞色素 b 在很长一段时间内, 人们都以为它们属于不同种类, 因此只有 1 个细胞色素 b 可以在加入琥珀酸后被还原, 而另 1 个则需加入连二亚硫酸盐后才能被还原。此外, 无论是在完整的线粒体中还是在被纯化后的复合体中, 这两个细胞色素 b 都显示不同的光谱。它们的中点电位也不相同, 即使在纯化后的细胞色素 b 双体中它们仍然有区别, 因而, 它们被分别命名为 b_k 或 b₅₆₂ (单由琥珀酸即可还原的组分) 和 b_r 或 b₅₅₆ (由连二亚硫酸盐还原的组分)。但是酵母线粒体的遗传学研究表明, 这两个细胞色素 b 的脱辅基蛋白 (apoprotein) 是由相同的结构基因编码的, 这说明它们的不同行为可能是由于其它因素所引起的。

复合体 III 可经 Triton X-100 处理从膜上分离下来, 之后用层析法分离可得纯化制剂, 当离子强度增加时, 它可以分成 3 部分, 其中最大的系由 6 个亚单位组成, 含细胞色素 b 与 c₁ (又称 bc₁ 复合体)。

复合体 III 结构研究的突破进展之一在于无论 bc₁ 或整个复合体都已获得可用于电镜分析的二维晶体, 从而为它的跨膜定位分布提供信息。图 4 是粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 线粒体复合体 III 根据电镜观察所获得的电子衍射结果经过三维重建所提出的各组分的跨膜定位分布的示意图。从图中可以看出, 复合体 III 的整体跨膜分布的总长度为 15nm。其中 5nm 位于疏水相内, 占总蛋白的 30% 左右。其余组分则分布于膜两侧与水相接触, 其中基质部分伸展长度为 7nm, 约占整个蛋白含量的 50%。

3.1.4 复合体 IV

复合体 IV 又称细胞色素 c 氧化酶, 是呼吸链的末端复合体, 催化还原细胞色素 c 的氧化和氧的还原。细胞色素 c 是电子供体, 因此细胞色素 c 氧化酶催化的反应式为



为了适应 4e⁻ 反应, 它含有 4 个进行 1 电子氧化还原基团: 两个血红素 (细胞色素 a 和 a₃) 以及两个能够从 Cu²⁺ 还原为 Cu⁺ 的铜原子 (CuA 和 CuB)。

复合体 IV 由 9—13 亚单位组成, 上述辅基 (细胞色素 a 与 a₃, CuA 与 CuB) 与这些亚单位相结合, 低等真核生物 (如酵母) 线粒体的细胞色素氧化酶含有 9 个亚单位, 其中 6 个系在细胞质中核糖体合成的, 3 个较大亚单位是在线粒体内合成的。高等真核生物 (包括人和牛) 线粒体的细胞色素氧化酶共有 13 个亚单位, 其中在细胞质中合成的增至 10 个。复合体 IV 的二维晶体的电子衍射结果通过三维重组已获得分辨率为 2nm 的结果, 并提出它的跨膜分布模型。

复合体 IV 很可能与复合体 I、III 一样, 在线粒体内膜上以二聚体形式存在。

复合体 IV 除传递电子外, 是否与复合体 I、III 一样具有质子移位的作用? 根据英国 Mitchell 提出的化学渗透假说, 将线粒体内膜的电子传递链形成 3 个回路 (详见后述), 这样, 电子传递链的末端氧化酶仅是一个电子传递体。1979 年左右, 芬兰年青生化学家 Wikstrom 通过大量实验提出细胞色素氧化酶也是一个质子移位体的观点。虽然 Mitchell 在很长一段时间内坚持原有

的观点,但国际上支持 Wikstrom 的观点越来越多,通过大量实验的验证,最后 Mitchell 也同意细胞色素氧化酶是一种质子移位体。

3.2 合成能源物质 ATP 的关键装置——ATP 合酶

磷酸化的关键装置——ATP 合酶(又称 H^+ -ATP 酶复合体,复合体 V)是线粒体氧化磷酸化耦联的关键装置,它能利用电子传递过程中释放的能量合成能源物质 ATP。根据前述电子传递链复合体 I、III、IV 都是质子移位体,而 ATP 合酶(复合体 V)则利用质子移位体产生的跨膜质子电化学梯差使 ADP 合成 ATP,也即使质子发生逆向回流,跨膜质子电化学梯差也随之消失(见图 5)

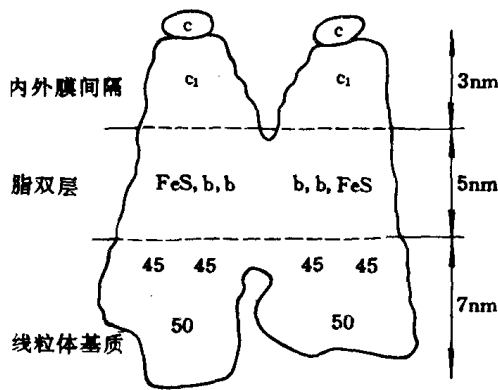


图 4 线粒体呼吸链复合体 III 各组分
的跨膜分布示意图

c, c_1 , b, 细胞色素 c, c_1 , b; FeS. 铁硫中心;
45, 50: 分子量为 45 000, 50 000 的亚单位

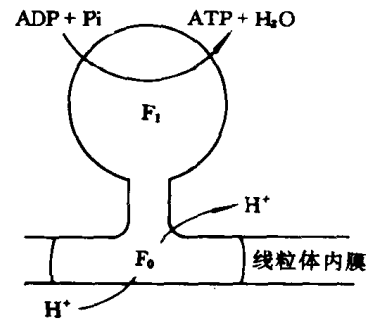


图 5 复合体 V (ATP 合酶, H^+ -ATP 酶)
利用跨膜质子梯差合成 ATP

采用低温电镜技术和负染方法可观察到线粒体内膜嵴两侧存在的圆或多面形颗粒,直径为 8—10nm。在 60 年代初期,美国 Green 和电镜专家 Fernandez-Moran 合作,提出这些颗粒可能是电子传递链最小功能单位,称为“基粒”,后来经过很多实验室的反复验证,否定了这种看法,美国 Racker 首先证明,这种颗粒就是 ATP 合酶的酶活性中心部分(F_1 -ATP 酶),能溶于水。ATP 合酶(H^+ -ATP 酶复合体)主要由 3 部分组成:(1)可溶性 ATP 酶,即 F_1 (或称 F_1 -ATP 酶);(2)嵌在膜疏水部分的片段,称为疏水蛋白 F_0 ;(3)连接 F_1 与 F_0 的“柄”,这部分包括赋予寡霉素敏感蛋白(oligomycin sensitivity conferring protein, OSCP)及其他诸如 F_6 等因子。 F_1 是直径为 9nm 的球形体,从牛心线粒体分离的 F_1 内含 5 种亚单位: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ 。每种亚单位在 F_1 的化学计量比尚有一些争议,倾向性的说法是 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 。在 F_1 部分还有一个分子量为 10 000 的抑制片段,它的一级结构已经基本搞清。因此, F_1 的分子量共为 370 000 左右(见图 6),嵌入膜内的疏水片段至少含 4 种亚单位,其中包括一个能与 H^+ -ATP 酶抑制剂二环己基碳二亚胺(DCCD)相结合的亚单位,分子量共为 70 000 左右。一般认为, F_0 具有质子导体的作用,它能传送质子,通过膜交给 F_1 的催化部位。连接 F_1 与 F_0 的部分称为“柄”,分子量约为 18 000。

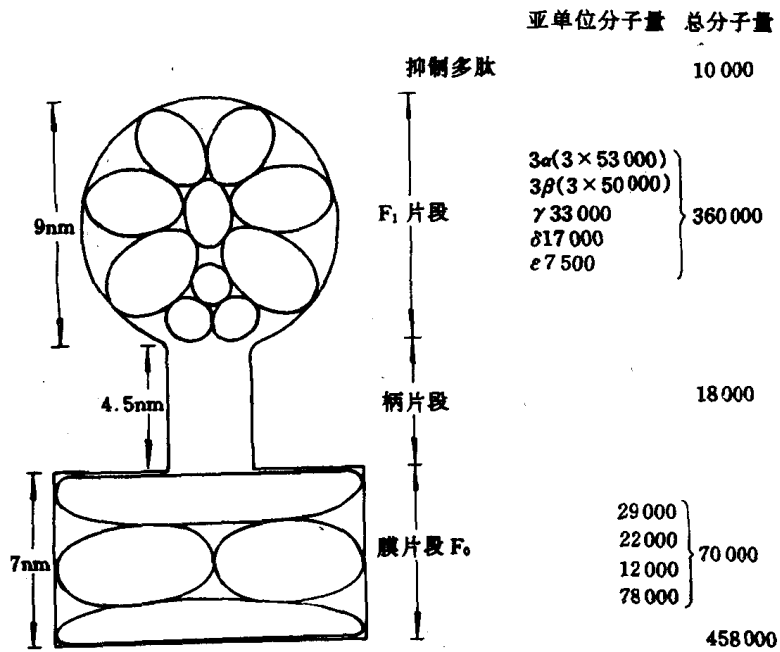


图 6 牛心线粒体 H⁺-ATP 酶复合体的组分、亚单位及分子量

H⁺-ATP 酶复合体的分布极为广泛，除线粒体内膜外，在叶绿体的类囊体膜、原核生物（如大肠杆菌、耐热细菌、嗜盐菌等）的质膜上都有分布。与线粒体 H⁺-ATP 酶复合体相比较，

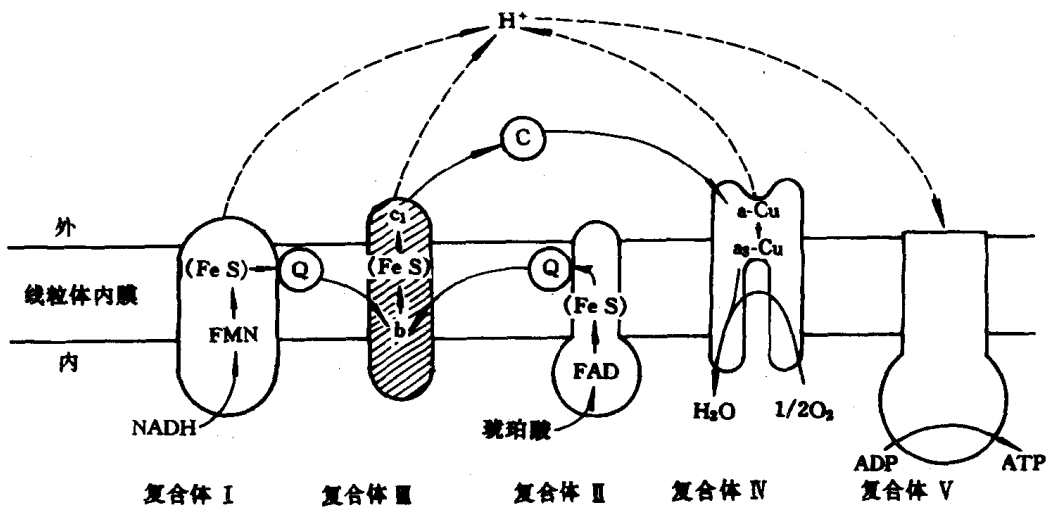


图 7 线粒体内膜电子传递链复合体 I—IV 之间电子传递途径以及形成的跨膜质子梯差通过复合体 V 合成 ATP 示意图

它们在亚单位的数量(尤其是F₀部分),各亚单位之间的化学计量比等都有一定的差异,但它们的结构与功能基本与线粒体内膜的H⁺-ATP酶复合体相似。

综合上述,线粒体内膜电子传递链复合体I—V的结构、功能及其跨膜分布的有关情况,可用图7、图8来概括示意。

近年来线粒体内膜催化能量转换的复合体在结构研究方面的趋势是争取获得它们的三维晶体,以便应用X-衍射方法来阐明其空间结构,探讨作用机制。复合体V(H⁺-ATP酶复合体)的F₁晶体已获得分辨率为0.36nm的结果。复合体Ⅲ、Ⅳ最近有报道也已获得三维晶体,可望于近年内获得较高分辨率的衍射结果。

3.3 氧化磷酸化的耦联机制

在生物能学(Bioenergetics)研究中,有关能量转换的机理一直是大家关注的中心问题。在50年代初期,Slater提出氧化磷酸化耦联的“化学假说”曾流行一时,1965年美国Boyer又提出“构象假说”。到60年代后期,英国Mitchell的“化学渗透假说”开始被人重视,实际上这一假说在1961年已经提出,但当时并未引起人们的注意。很有意思的是,在同一年英国的Williams也提出H⁺是氧化(能量释放)与磷酸化(能量贮存)之间的一个重要中介。他与Mitchell的观点不同之处在于H⁺并不跨膜运送而在膜内部通过与合成ATP酶系直接耦联而进行能量转移。到1966年,化学渗透假说趋于成熟。70年代中期,由于获得国际上很多实验室的大量支持,它已成为能量转换机理中最为流行的一种假说,从而使Mitchell荣获1978年诺贝尔化学奖。但是,即使在当时,有些科学家对这一假说的某些内容已经持有不同的看法,加之Williams等的意见,所以国外有些同行议论,Mitchell所获得的是“一个有争议的诺贝尔奖”。之后,一方面化学渗透假说继续获得不少的支持,另一方面又不断发现有不少与它相矛盾的实验结果。因此,美国Boyer提出了与Mitchell假说有显著不同的新见解。Slater也提出一种电子传递的氧化还原酶蛋白与ATP合酶直接碰撞而进行能量转换的‘碰撞假说’(collision hypothesis)。此外,还有对Mitchell假说进行修正的一些论述。下面将扼要介绍这方面的情况。

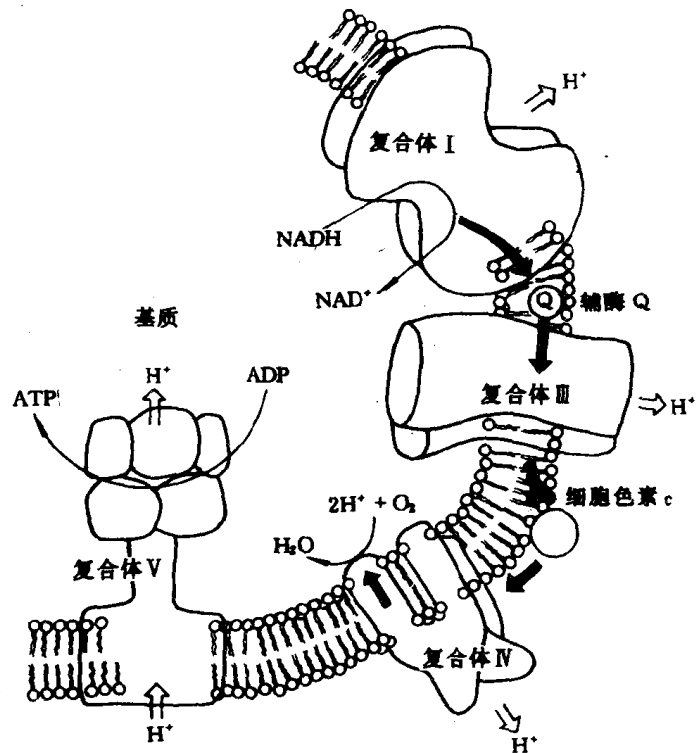
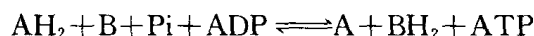
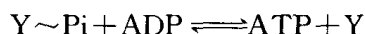
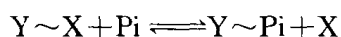
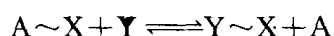
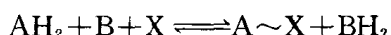


图8 线粒体内膜电子传递链复合体I、Ⅲ、Ⅳ、V的结构、功能及跨膜分布示意图

3.3.1 化学假说

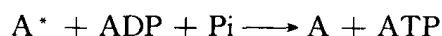
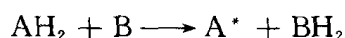
提出时间最早，它主要参照在糖酵解过程中，3-磷酸甘油醛 \rightleftharpoons 1,3-二磷酸甘油酸形成高能键的反应提出的。根据化学假说，电子传递时高能磷酸键的合成是由于化学能的直接转换。电子传递释出的化学能直接转入 ATP 的前体而后再生成 ATP。这个假说以下式来表示：



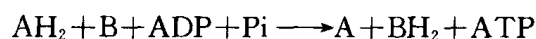
在上式中 A 与 B 是 2 个电子传递体，X 与 Y 是 2 个假设的、迄今并未能分离得到的耦联因子，这个假说在氧化磷酸化研究的早期曾占有很重要的位置。但主要的问题在于始终未能分离出高能键的中间递体。

3.3.2 变构假说

随着蛋白质结构研究的进展，并受到肌肉收缩作用机理的启发，Boyer 提出了变构假说，它认为在电子传递过程中并不形成含高能键的中间递体，而是通过蛋白质构象变化来形成 ATP 的。在电子传递过程中氧化还原递体的构象可能首先发生变化，这个变化继而引发 ATP 酶分子形成一个高能键，接着后者使 ADP 和 P_i 合成 ATP。变构假说可用下列反应来表示：



总反应是：



A^* 代表电子（氢）递体的高能构象，如果将化学假说与变构假说加以比较，可以看出二者十分相似，只不过变构假说认为电子传递释出的能量原始不是贮存在共价键中而是积贮于蛋白质肽键的立体结构之中。这一假说同样存在着实验验证的困难。后来 Boyer 不断修正与发展变构假说（详见后述）。因此，它在氧化磷酸化耦联机理研究中有不小的影响。

3.3.3 化学渗透假说

它是 Mitchell 在 1961 年提出的，1966 年趋于成熟。根据这一假说，呼吸链在线粒体内膜构成 3 个回路 (loops)，电子与氢的交替传递使 H^+ 发生定向转移，从膜的一侧运送到另一侧，由于膜对 H^+ 是不通透的，因而使膜内外形成了质子动力势 (proton motive force Δp ，也称之为质子电化学梯度 $\Delta \bar{\mu}_{\text{H}^+}$)。质子动力势 Δp 的单位为 mV。

$$\Delta p = \Delta \psi - \frac{2.3RT}{F} \Delta \text{pH}$$

其中 $\Delta \psi$ 为膜电位。 ΔpH 为膜内外的 pH 差。 F 为法拉第常数， R 为气体常数。 T 为绝对温度。