

猪心线粒体 F_0 的纯化、重建及其质子转运功能*

杨挥 张玲 张旭家 黄有国**

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

摘要 比较了猪心线粒体 F_0F_1 -ATPase 膜部分 F_0 的四种纯化方法. 结果表明, 用 NaBr 从亚线粒体除去 F_0F_1 -ATPase 的水溶性部分 F_1 -ATPase 后, 再以 CHAPS 增溶, 并经蔗糖梯度离心, 可获得高纯度的 F_0 . SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定表明, 纯化的 F_0 含有 b、OSCP (寡霉素敏感授予蛋白) d、a、e、 F_6 、IF₁、A6L 和 c 等 9 种亚基. 用去污剂稀释法将纯化的 F_0 在脂质体上重建后, 重建 F_0 表现较高的被动转运质子活性. 这为在体外深入研究 F_0 的活性、构象与膜脂的关系, 以及 F_0 与 F_1 -ATPase 的组装等提供了很好的实验模型.

关键词 亚线粒体, F_0 , 重建, H^+ 转运

学科分类号 Q71

线粒体 F_0F_1 -ATPase 包括膜外可溶性部分 F_1 -ATPase、膜内疏水部分 F_0 以及连接二者的柄部. F_1 -ATPase 由 α (α_3) β (β_3) γ 、 δ 和 ϵ 等五种亚基组成. 1994 年, Abrahams 等^[1]在 0.28 nm 分辨率水平解析了牛心线粒体 F_0F_1 -ATPase 中 F_1 -ATPase 的三维结构. 目前, 研究的注意力已转向 F_0 部分的结构与功能. 由于 F_0 的分离纯化很难, 至今除鉴定出 *E. coli* 的 F_0 由亚基 a、b₂、c₉₋₁₂ 组成外, 有关其他来源的 F_0 的亚基组成报道不多. Collinson 等^[2]报道的牛心线粒体 F_0 至少含有 b、d、a、e、f、g、A6L 和 c 等亚基. 有关猪心线粒体 F_0 的亚基组成尚未见报道. 已知 F_0 是 F_0F_1 -ATPase 的质子通道, 能跨膜转运质子. 那么, F_0 转运质子的机理如何? F_0 的质子转运功能与其周围的膜脂有何关系? 将纯度较高的 F_0 在脂质体重建是研究其质子转运活力的重要途径. 本文从猪心线粒体纯化 F_0 , 分析其组分, 并成功地在脂质体上重建获得了较高的质子转运活力, 为进一步研究重建 F_0 的活性与膜脂的关系提供了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜猪心购自北京市第三肉联厂并置于冰中即用. {3- [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -propanesulfonate} (CHAPS) n-dodecyl β -D-maltoside (DM) 寡霉素 (oligomycin) valinomycin、carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) 均购自 Sigma 公司. 大豆磷脂 (asolectin) 购自 Fluka 公司. 9-

amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) 购自 Molecular Probes 公司. DL-Dithiothreitol (DTT) 购自 ICN 公司. 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) 购自 Promega 公司. 其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 亚线粒体的制备: 基本参照 Lutter^[3]的方法. 分离的亚线粒体贮存于 PA 缓冲液 (0.15 mol/L KP_i, pH 7.9, 1 mmol/L ATP, 25 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 5% 的乙二醇, 0.001% PMSF), -20°C 保存备用.

1.2.2 F_0F_1 -ATPase 的分离和纯化: 基本上按 McEnergy^[4]的方法并加以改进. 将亚线粒体悬液于 105 000 × g 离心 45 min, 沉淀悬于 TA 缓冲液 (50 mmol/L Tricine, pH 7.9, 含 1 mmol/L ATP, 25 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 5% 的乙二醇, 0.001% PMSF), 使蛋白质浓度为 8 g/L. 加入 10% 的 CHAPS 至终浓度为 1.2%, 于冰浴中轻搅拌 30 min, 105 000 × g 离心 1 h, 收集上清. 每 6.5 ml 上清铺于 32 ml 25% 的蔗糖溶液 (蔗糖溶于含 0.2% CHAPS 的 TA 缓冲液) 上, 用 Beckman SW28 Ti 转头经 25 000 r/min (2°C) 离心 10 h, 弃去每管上层 9 ml 及下层 3 ml 溶液, 收集剩余部

* 国家自然科学基金委重点项目 (39730130) 和中国科学院重大项目 (KJ951-A1-601).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888518, E-mail: Huang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-04-06, 接受日期: 2000-06-07

分. 加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 40%, 冰浴静置 15 min, 高速离心 15 min, 沉淀溶于 50 ml TA 缓冲液中, 用 Amicon 超滤装置浓缩以去除随蛋白质沉淀中的 CHAPS. 纯化的 F_0F_1 -ATPase 于 -80°C 冻存备用.

1.2.3 F_0 的分离和纯化: 于 30 ml 亚线粒体 (蛋白质浓度为 10 g/L) 悬液边搅拌边加入固体 NaBr 及蔗糖, 使终浓度分别为 4 mol/L、0.25 mol/L, 于冰浴中轻搅拌 30 min, $105\,000 \times g$ 离心 20 min, 取飘浮的沉淀用 PA 缓冲液匀浆, 同上重复处理一次, 向沉淀加入 60 ml PA 缓冲液并匀浆, $105\,000 \times g$ 离心 20 min, 再用 PA 缓冲液洗一次, 用适量 TA 缓冲液匀浆沉淀, 加入 10% 的 CHAPS 使其终浓度为 1.2%, 蛋白质浓度为 4 g/L, 冰浴条件下轻搅拌 30 min, $105\,000 \times g$ 离心 1 h, 收集上清. 每 6.5 ml 样品液转移到 32 ml 20% 的蔗糖梯度溶液 (蔗糖溶于含 0.2% CHAPS 的 TA 缓冲液) 上, 用 Beckman SW28 Ti 转头经 $27\,500 \text{ r/min}$ (2°C) 离心 10 h, 弃去每管上层 10 ml 溶液, 收集其余部分用 Amicon PM-30 膜超滤浓缩. 纯化的 F_0 于 -80°C 冻存备用.

1.2.4 F_1 -ATPase 的提纯: 基本上按 Beechey^[5] 的方法并加以改进, 将亚线粒体悬液于 $105\,000 \times g$ 离心 45 min, 沉淀重悬于缓冲液 (10 mmol/L Tris- H_2SO_4 , pH 7.5, 含 0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT 及 0.001% 的 PMSF) 中, 使蛋白质浓度为 5 g/L. 加入 0.5 体积的氯仿并于 20°C 剧烈振荡 30 s. 所得乳浊液先经 $11\,000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清于 20°C 、 $105\,000 \times g$ 离心 30 min. 再收集上清, 加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 37.5%, 冰浴静置 15 min, 然后于 4°C 、 $15\,000 \times g$ 离心 15 min. 收集上清, 继续加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 52.5%, 冰浴静置 15 min, 然后再于 4°C 、 $15\,000 \times g$ 离心 15 min, 沉淀悬浮于 52.5% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中, 4°C 保存备用.

1.2.5 纯化的 F_0 在脂质体上重建及质子转运活力的测定: F_0 的重建基本上按 McEnery^[6] 的方法但加以改进. 取一定量纯化的大豆磷脂, 用氮气流将溶解大豆磷脂的有机溶剂吹干, 加入适量 Tricine-KOH 缓冲液 (10 mmol/L Tricine, pH 7.5, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L MgCl_2) 及 10% 的 CHAPS (溶于上述缓冲液), CHAPS 终浓度为 1.2%, 磷脂为 30 g/L. 将磷脂悬液用 Cole Parmer 公司 CPX 600 型超声波仪 (CV26 型探头) 适当强度

超声 10 min (冰浴冷却), 直至悬液透明. 将 F_0 加入超声制备的脂质体溶液中 (脂:蛋白质保持一定重量比), 冰浴放置 30 min, 然后加入 20 倍体积含 0.2 mol/L KCl 的 Tricine-KOH 缓冲液稀释, 于 $105\,000 \times g$ 离心 30 min, 将沉淀即含 F_0 的脂蛋白体悬浮于含 0.2 mol/L NaCl 的 Tricine-KOH 缓冲液, 用于测定重建 F_0 的被动转运 H^+ 活力.

测活时, 取含 $20 \mu\text{g}$ F_0 的脂蛋白体加入 2 ml 含 0.2 mol/L NaCl 的 Tricine-KOH 缓冲液, 于 20°C 保温 10 min, 然后加入 $5 \mu\text{l}$ (20 mg/L) 的 valinomycin 以利 K^+ 扩散出脂蛋白体, 产生的膜电位推动 F_0 向膜内转运 H^+ , 并与 H^+ 敏感荧光探针 ACMA (激发波长 410 nm, 发射波长 490 nm) 结合而引起荧光猝灭, 荧光猝灭的程度反映了 H^+ 转运活力的大小. 在测定 H^+ 转运活性中或反应基本结束时, 加入 $1 \mu\text{l}$ (1 mmol/L) 的 CCCP 以检测脂蛋白体的封闭性. 测定 H^+ 转运活力时, 以不含 F_0 的脂质体作对照.

1.2.6 F_1 -ATPase 与 F_0 的组装: 将 $50 \mu\text{g}$ F_0 脂蛋白体与 $135 \mu\text{g}$ F_1 -ATPase 混合, 25°C 保温 45 min, 然后加入 20 倍体积的 Tricine-KOH 缓冲液, 于 $105\,000 \times g$ 离心 30 min, 沉淀即重建的 F_0F_1 -ATPase 悬浮于相同缓冲液, 用于酶的水解活力测定.

1.2.7 ATPase 活力的测定: 按 Serrano^[7] 的方法进行.

1.2.8 蛋白质含量测定及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 蛋白质含量的测定采用 Simpson 法^[8] 或者 Bradford 法^[9]. 两种方法均以 BSA 作标准.

凝胶电泳采用 BioRad 公司的电泳系统, 按说明配胶及缓冲液, 4% 的浓缩胶、18% 的分离胶. 向样品溶液加入等体积的有机溶剂 (氯仿和甲醇体积比为 1:3) 以沉淀蛋白质并去脂, 沉淀悬浮于样品缓冲液, 煮沸 2 min 后上样.

1.2.9 磷脂含量的测定: 样品溶液经沙浴 10 min 蒸干以除去所有溶剂, 加入 $300 \mu\text{l}$ 70% 的高氯酸沙浴消化 20 min, 然后用 Laird^[10] 的方法测定无机磷含量.

2 结果和讨论

2.1 不同方法分离 F_0 的纯度

我们用盐酸胍去除亚线粒体 F_1 -ATPase, 并以 CHAPS 增溶后经 20% 的蔗糖梯度离心纯化, 用盐酸胍解离亚线粒体 F_1 -ATPase 并以 DM 增溶后经柱层析 (BioRad 中压 Q_{10} 、 S_5 及 Q_2 柱) 纯化, 用

CHAPS 从亚线粒体增溶 F_0F_1 -ATPase 经 25% 的蔗糖梯度离心纯化并以 NaBr 去 F_1 -ATPase 或以 NaBr 从亚线粒体去 F_1 -ATPase 再用 CHAPS 增溶 F_0 并经 20% 的蔗糖梯度离心纯化 (材料与方法中 1.2.3) 等四种方法从猪心线粒体内膜纯化 F_0 , 用 1.2.3 法纯化的 F_0 之 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 结果如图 1 所示. 可以看出, 纯化的 F_0 纯度较高,

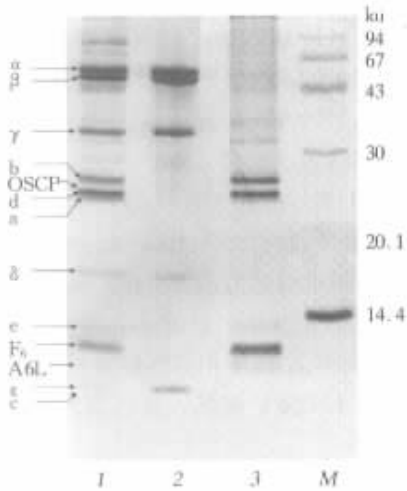


Fig. 1 SDS-PAGE profiles of F_0F_1 -ATPase, F_1 -ATPase and F_0 (by 1.2.3) purified from porcine heart mitochondria

1: F_0F_1 -ATPase; 2: F_1 -ATPase; 3: F_0 ; M: molecular weight marker.

且含 OSCP 亚基. 参考已报道的哺乳动物线粒体 F_0F_1 -ATPase、 F_0 的凝胶电泳图谱结果, 经指认, 纯化的猪心线粒体 F_0 主要含有 b、d、a、e、 F_0 、IF₁、A6L 及 c 等 8 种亚基和少量 OSCP, 亚基组成与 Collinson 等^[2]报道的用三步层析方法纯化的牛心线粒体 F_0 的组成基本相似. 本文用 1.2.3 法纯化的猪心线粒体 F_0 可能不含 f、g 等亚基. 对用 1.2.3 法纯化的猪心线粒体 F_0 的 SDS-PAGE 凝胶扫描, 并计算 F_0 各亚基的蛋白量之和占总蛋白量的比例表明分离的 F_0 纯度约为 85%. 与亚线粒体相比 F_0 的产率约 1%. 上述四种方法比较表明, 盐酸胍和 NaBr 两种不同的变性剂, 都能解离 F_1 -ATPase. 用盐酸胍处理亚线粒体的时间虽短, 却能将 OSCP 从 F_0 去除, 但较 NaBr 处理剧烈得多, 可能影响纯化的 F_0 的质子转运活力. 而用 NaBr 处理 F_0F_1 -ATPase 解离 F_1 不完全, 纯度较低, 仍含 OSCP. 鉴于两种去 F_1 -ATPase 的方法都不够理想, 我们尝试用 NaBr 直接从亚线粒体上解离 F_1 -ATPase, 选择合适的 NaBr 浓度及作用时间, 在蛋白质浓度为 10 g/L, 用 4 mol/L 的 NaBr 处理 30 min, 并重复处理一次的

条件下获得了很好的解离效果. 不仅完全去除了 F_1 -ATPase 的各个亚基, 而且所得 F_0 保留了一定的 OSCP, 与 F_1 -ATPase 重组后表现水解活力及其对 oligomycin 的敏感性. DM 抽提、三步层析纯化所得 F_0 纯度虽然很高 (约 96%), 但纯化的 F_0 对 K^+ 通透而不能利用 K^+ 产生的扩散电位来测定 F_0 转运 H^+ 的功能. 因此用 1.2.3 法所得的 F_0 纯度较高, 不含 F_1 -ATPase 的亚基, 重组后有较高被动转运 H^+ 活力, F_1 -ATPase 与 F_0 重组装后的水解活力较高, 且对 oligomycin 敏感.

2.2 重建 F_0 的功能

F_0 是 F_0F_1 -ATPase 与膜脂紧密结合的膜内部分, 内在膜蛋白的活性与膜脂的存在密切相关. 为了研究纯化的膜蛋白的功能, 将其在脂质体上重建并检测其活力是一种主要而有效的手段. 因此, 在尝试了不同重建 F_0 的方法后, 用去污剂稀释法将纯化的 F_0 在脂质体上重建, 检测重建 F_0 的质子转运活力以及与 F_1 -ATPase 重组形成 F_0F_1 -ATPase 的水解活性及其对抑制剂 oligomycin 的敏感性, 是获得具有功能活性的纯化 F_0 的重要实验证据.

2.2.1 重建 F_0 的质子转运活力: 参照文献 [6] 方法重建含 F_0 的脂蛋白体经检测其封闭性不理想, 质子转运活力很低, 重复性也较差. 通过对各种因素和条件的试验, 发现重建时的脂/蛋白质比可明显影响脂蛋白体的封闭性和质子转运活力. 如图 2 示, 在不同的脂/蛋白质比条件下, 重建 F_0 转运质子活性表现明显差异, 脂/蛋白质比较低或过高时, 重建 F_0 的质子转运活力都不高, 且很容易泄漏. 在脂/蛋白质比为 150:1 时, 重建 F_0 的质子转运活力最高, 加入 valinomycin 后 10 s 内 ACMA 荧光猝灭达 5.7%. 同时, 也发现温度对重建 F_0 的质子转运活力具有明显的影响. 如图 3 所示, 当温度为 20°C 时重建 F_0 的质子转运活力最高. 已知 oligomycin 是 F_0F_1 -ATPase 的专一性抑制剂. 重建 F_0 的 H^+ 转运活力对 oligomycin 也表现出很高的敏感性 (图 4), 这进一步证明纯化的 F_0 具有较高的纯度和功能活性. 当将纯化的 F_0 在纯磷脂 PC、PE 和心磷脂 (CL) 制备的脂质体上重建时, 初步实验结果表明, PE、CL 对重建 F_0 的质子转运活力有促进作用 (数据略). 这些结果清楚表明, 纯化的 F_0 的质子转运功能与膜脂具有密切关系.

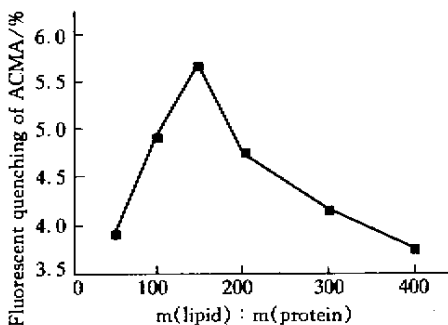


Fig.2 Effect of lipid:protein mass ratio on the passive proton translocation activity of reconstituted F₀

20 μg F₀ vesicles were added into 2 ml Tricine-KOH buffer containing 0.2 mol/L NaCl. The mixture was incubated at 20°C for 10 min, then 5 μl valinomycin (20 mg/L) was injected into the mixture with stirring. H⁺ translocation activity of the reconstituted F₀ was expressed as fluorescent quenching of ACMA exactly at 10 s after the addition of valinomycin. Experiment was performed on the HITACHI F-4500 fluorescence spectrophotometer. The excitation wavelength was 410 nm, and the emission wavelength was 490 nm.

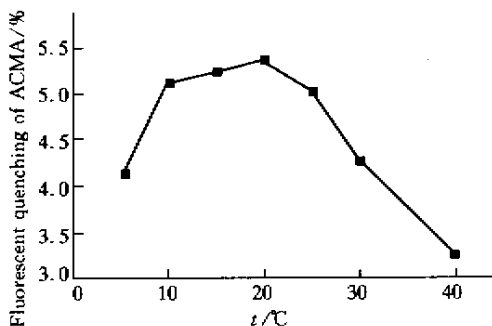


Fig.3 Effect of temperature on the proton translocation activity of the reconstituted F₀

Experimental conditions were as for Fig 2. The activity of various sample should be examined at different temperature.

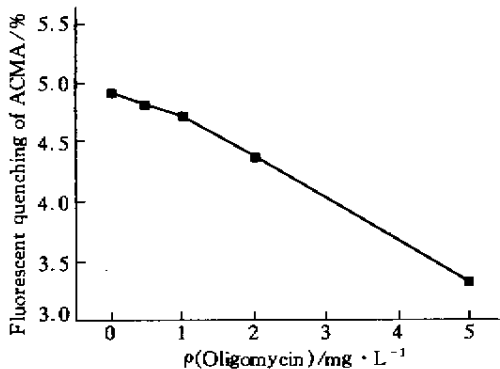


Fig.4 Effect of oligomycin on the proton translocation activity of the F₀ vesicles

Experimental procedure was as for Fig 2. Different concentration of oligomycin should be added to various sample before incubation.

2.2.2 F₁ 与 F₀ 重组后 F₀F₁-ATPase 的水解活力及其对 oligomycin 的敏感性: 已知分离的 F₁-ATPase 具有水解 ATP 的酶活性, 但因其未与 F₀ 结合而不表现对 oligomycin 的敏感性. 而在体外将纯化的 F₁-ATPase 和 F₀ 重组形成 F₀F₁-ATPase 复合体后, 其水解活力即表现对 oligomycin 的敏感性. 因此, 测试重建 F₀F₁-ATPase 复合体水解活力及其对 oligomycin 的敏感性, 也是鉴定纯化的 F₀ 和 F₁-ATPase 是否具有功能活性的重要指标. 以适当的比例将纯化的 F₀ 与 F₁-ATPase 共同保温并将未重组上的 F₀ 和 F₁-ATPase 除去后, 测定重建的 F₀F₁-ATPase 水解活力, 结果表明, 在无 oligomycin 存在时, 活力为 1.52 μmol / (min · mg), 与 oligomycin 保温后, 其水解活力为 0.67 μmol / (min · mg), 即重建 F₀F₁-ATPase 的水解活力被 oligomycin 抑制 56%. 重建 F₀F₁-ATPase 水解活力对 oligomycin 的较高敏感性亦表明分离的 F₀ 的纯度和活性较高. 同时提示, 纯化的 F₀ 仍含有 OSCP 亚基, 从而有利于 F₁-ATPase 和 F₀ 的结合.

综上所述, 我们用较简便的方法从猪心线粒体中获得了纯度高和功能活性状态好的 F₀. 由于 F₀ 的纯化和重建的难度都比较大, 至今有关体外重建 F₀ 的质子转运功能及其与膜脂的相互关系的研究报道甚少. 本文有关猪心线粒体 H⁺-ATPase 的质子通道 F₀ 的纯化及其亚基组成的分析, 以及重建 F₀ 质子转运活力与磷脂的关系的实验结果, 对于进一步深入研究和阐明 F₀ 的功能、构象、F₀ 与 F₁ 之间的相互作用等与膜脂的关系都提供了可行性.

参 考 文 献

- 1 Abrahams J P, Leslie A G W, Lutter R, *et al.* Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 1994, **370** (6491): 621 ~ 628
- 2 Collinson I R, Runswick M J, Buchanan S K, *et al.* F₀ membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry*, 1994, **33** (25): 7971 ~ 7978
- 3 Lutter R, Abrahams J P, van Raaij M J, *et al.* Crystallization of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *J Mol Biol*, 1993, **229** (3): 787 ~ 790
- 4 McEnery M W, Buhle E L Jr, Aebi U, *et al.* Proton ATPase of rat liver mitochondria. Preparation and visualization of a functional complex using the novel zwitterionic detergent 3- [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate. *J Biol Chem*, 1984, **259** (7): 4642 ~ 4651
- 5 Beechey R B, Hubbard S A, Linnett P E, *et al.* A simple and rapid method for the preparation of adenosine triphosphatase from

- submitochondrial particles. *Biochem J*, 1975, **148** (3): 533 ~ 537
- 6 McEnery M W, Hüllihen J, Pedersen P L. F_0 " proton channel " of rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 1989, **264** (20): 12029 ~ 12036
- 7 Serrano R, Kanner B I, Racker E. Purification and properties of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex of bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, 1976, **251** (8): 2453 ~ 2461
- 8 Simpson I A, Sonne O. A simple, rapid, and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation. *Anal Biochem*, 1982, **119** (2): 424 ~ 427
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248 ~ 254
- 10 Laird D M, Parce J W, Montgomery R I, *et al.* Effect of phospholipids on the catalytic subunits of the mitochondrial F_0F_1 -ATPase. *J Biol Chem*, 1986, **261** (31): 14851 ~ 14856

Purification , Reconstitution and H^+ Translocation Activity of Porcine Heart Mitochondrial F_0 *

YANG Hui , ZHANG Ling , ZHANG Xu-Jia , HUANG You-Guo **

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

Abstract Four methods were compared to purify F_0 from porcine heart mitochondria. The best results were obtained by the following method : after removing F_1 -ATPase with NaBr incubation from submitochondrial F_0F_1 -ATPase , F_0 was solubilized with CHAPS and purified by sucrose density gradient centrifugation. SDS-PAGE with silver staining showed about 85% purity of the isolated F_0 and 9 different subunits including b , OSCP , d , a , e , F_6 , IF_1 , A6L and c. The purified F_0 was then incorporated into asolectin liposomes , the reconstituted F_0 showed higher H^+ translocation activity and after F_0 was reconstituted with F_1 -ATPase , the resulted F_0F_1 -ATPase complex exhibited high ATP hydrolysis activity and high sensitivity to oligomycin. The results provide evidence for successful purification , reconstitution of F_0 with high H^+ translocation activity and its relationship with phospholipids.

Key words submitochondria , F_0 , reconstitution , H^+ translocation

* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (39730130) and Key Research Project of the Chinese Academy of Sciences (KJ951-A1-601).

** Corresponding author. Tel : 86-10-64888518 , E-mail : Huang@sun5.ibp.ac.cn

Received : April 6 , 2000 Accepted : June 7 , 2000