

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 Δ (*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 培养基平皿上生长 , 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) .

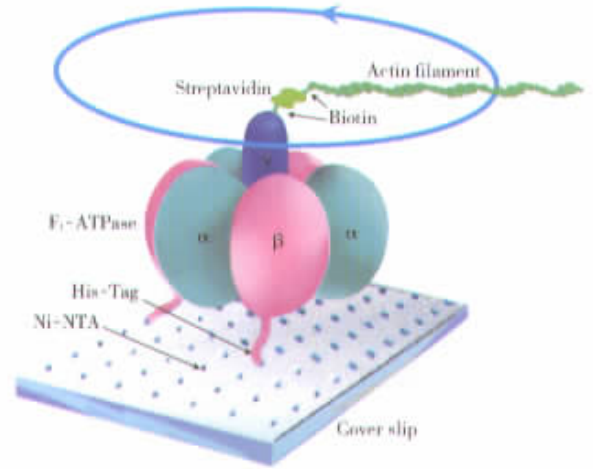


Fig.1 The system used for observation of F₁-ATPase rotation

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 F₁-ATP 酶旋转 : 在倒置荧光显微镜

Olympus IX71 (或 BO3) 下观察 (40 ×), 用电荷偶合组件 (charged coupled device , CCD , MicroMax : 782YHS , Princeton Instruments) 记录.

2 结 果

2.1 F₁-ATP 酶的 ATP 水解活性

从图 2 中可以看到, 纯化的 F₁-ATP 酶有 3 个亚基 (α , β 和 γ 亚基). 图 3 表示纯化的 F₁-ATP 酶的 ATP 水解活性达到 6 U/mg (测定温度为 30℃ , 缓冲体系为 50 mmol/L Tris-HCl , pH 8.0 , 10 mmol/L KCl , 2 mmol/L MgCl₂ , 0.15 mmol/L NADH , 0.4 mmol/L PEP , 2 mmol/L ATP , 4 U LDH 和 4 U PK).

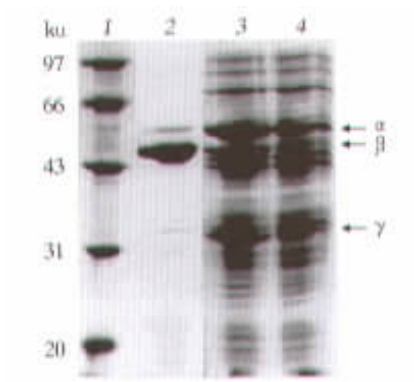


Fig.2 SDS-PAGE(15%) of the F₁-ATPase

1 : molecular mass marker ; 2 : purified F₁-ATPase ; 3 : after induced ; 4 : before induced.

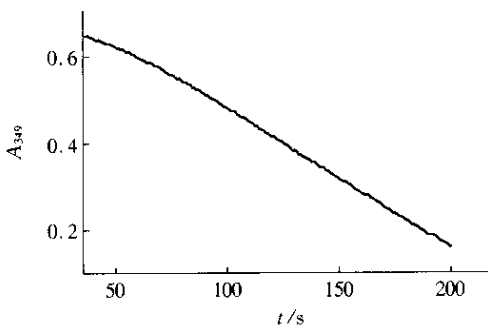


Fig.3 The ATP hydrolysis activity of F₁-ATPase

2.2 F₁-ATP 酶主要生化特性

已有文献报道 LDAO 可以将野生型 F₁-ATP 酶水解活性提高约 4 倍, 但对突变型 F₁-ATP 酶则表现明显抑制作用^[10]. 对本研究的突变型 F₁-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 F₁-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, F₁-ATP 酶水解的活性反而下降. NaN₃ 浓度的变化对 F₁-ATP 酶活性的影响结果如图 4b 所示, NaN₃ 浓度的增加(0 ~ 2 mmol/L), 其 F₁-ATP 酶水解的活性迅速下降, 继续增加 NaN₃ 浓度, 对 F₁-ATP 酶水解的活性抑制近 70%.

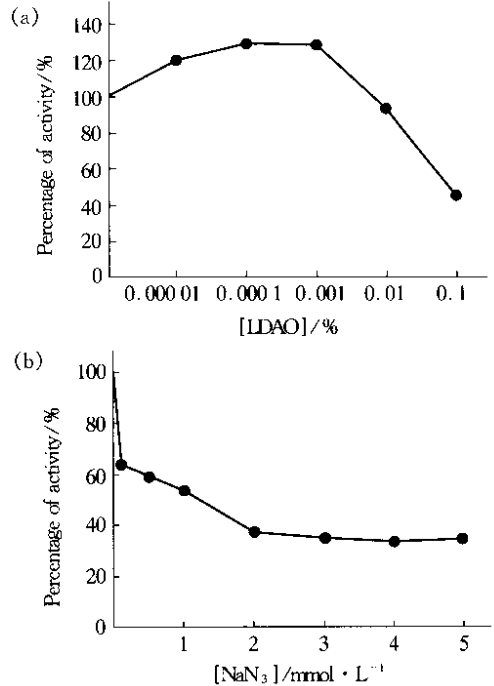


Fig.4 The effect of concentration of LDAO(a) and NaN₃(b) on the ATP hydrolysis activity of F₁-ATPase

2.3 单分子水平研究 F₁-ATP 酶水解时逆时针方向旋转

图 5 为在 F₁-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 NaN₃ 时, 基本抑制 F₁-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 57pN · 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%.

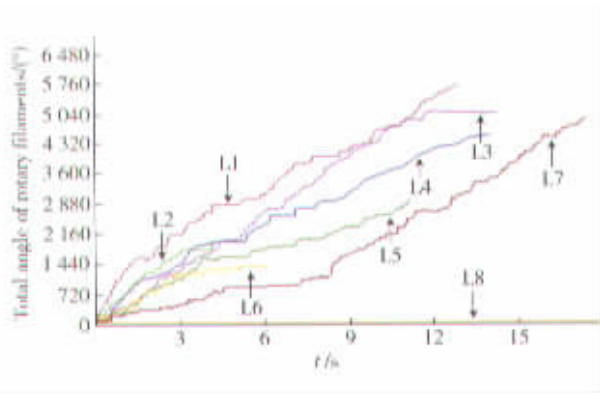


Fig.5 The total angle of the rotation filaments with the time increasing

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^[1]. ²⁾In the presence of 2 mmol/L ATP and 5 mmol/L NaN_3 for these control experiments. ³⁾L8 not included.

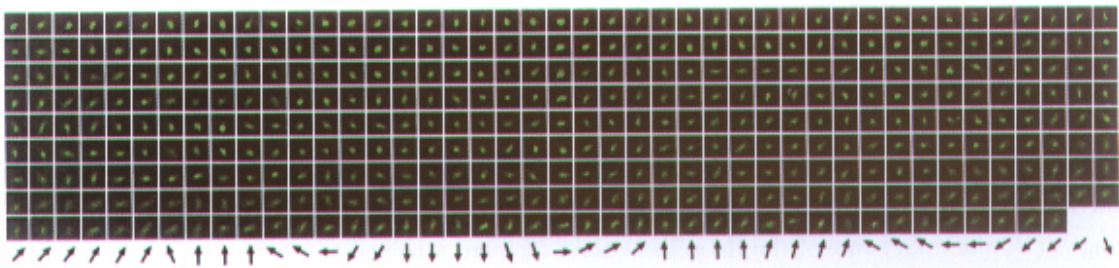


Fig.6 The images of fluorescent filament of L3 and the rotation angle of the first row images

Time interval between images is about 0.037 s.

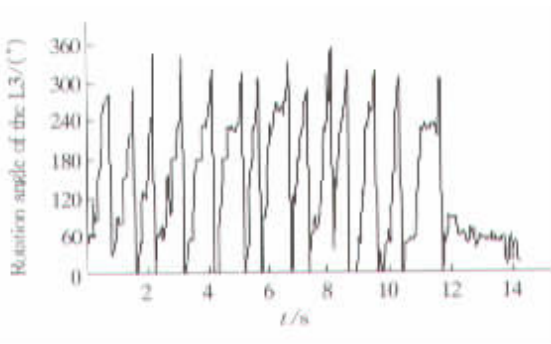


Fig.7 Rotation angle of fluorescent filament of L3



Fig.8 Fluorescent filament L3 rotation

3 小 结

在本研究中筛选出一株高质量的 F_1 -ATP 酶菌株, 纯化后, 其水解活性要比文献 (一般 PS3 F_1 -ATP 酶水解活性在同样条件下约为 $3 \text{ U}/\text{mg}^{[5,8,11]}$) 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, Yoshia M, *et al.* Direct observation of the rotation of F_1 -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 Jean-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