

文章编号: 1007-4627(2007)01-0065-07

生物物理新技术在 ATP 合成酶超分子结构中的应用*

朱 杰, 王国栋

(西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 现代物理技术与方法的发展为腺苷三磷酸(ATP)合成酶分子的研究提供了丰富而有效的手段。介绍了 ATP 合成酶研究中常用的物理技术与方法如质谱技术、核磁共振技术、X 射线衍射技术、红外光谱和紫外光谱技术的物理原理及其在 ATP 合成酶研究中的应用, 并重点介绍了新兴非常规手段如原子力显微镜、荧光共振能量转移技术在 ATP 合成酶研究中的最新研究成果; 通过对比诸多技术与方法近年来在国内外研究中的进展情况, 对各种技术与方法的优缺点进行了阐述。

关键词: 生物物理新技术; 腺苷三磷酸合成酶; 超分子结构

中图分类号: O753.2 **文献标识码:** A

1 引言

蛋白结构可分为链式和聚集态结构, 其中链式结构包括一级结构和二级结构, 即高分子链的组成、构造、构型、分子大小和尺寸、构象与形态; 聚集态结构是由多肽链聚集在一起形成的蛋白内部结构, 即蛋白的非晶态、晶态、液晶及多相态结构等。蛋白生物物理研究主要是用现代物理技术表征蛋白的一级至三级和聚集态结构(四级结构)及各级结构与蛋白功能间的关系^[1]。20 世纪 50 年代以来, 蛋白结构的研究受到各相关领域研究人员的高度重视, 并取得了丰硕的成果。ATP 合成酶是广泛存在于线粒体、叶绿体和细菌中的能量转化核心酶, 它利用呼吸链电子传递产生的质子跨膜转运势能来驱动二磷酸腺苷(Adenosine Diphosphoric acid, 简称 ADP)和无机磷 Pi 合成腺苷三磷酸(Adenosine Triphosphoric acid, 简称 ATP), 也是线粒体氧化磷酸化和叶绿体光合磷酸化偶联的关键器件, 是生命体能源物质合成不可或缺的一种蛋白^[2]。到目前为止, 通过生化手段对该酶复合体进行了精心的分离与纯化, 已基本确定了该酶的主要组成及其催化 ATP 合成的事实^[3]; 但功能总决定于特定的物理结构, 因而人们总是尝试用物理的技术与方法对酶的空间构象和晶体结构进行研究, 以期从结构上解

释 ATP 合成酶的功能基础^[4]。各种生物物理技术与方法诸如质谱学、光谱学、波谱学、电子显微术、原子力显微术和荧光共振能量转移技术等, 在 ATP 合成酶结构的研究中已取得了显著成功, 并极大地推动了该酶的研究^[5-40]。本文综述了相关技术在 ATP 合成酶结构与功能研究中的应用。

2 质谱技术

质谱方法(MS)是通过测定蛋白分子量而进行蛋白鉴定、蛋白修饰和蛋白相互作用来开展研究的。电喷雾电离质谱和软激光解吸电离质谱是研究蛋白分子较为常用的质谱方法。电喷雾电离原理可按电荷残留模型予以描述: 带电液滴蒸发, 液滴变小, 液滴表面相斥的静电荷密度增大。当液滴蒸发到某一程度时, 液滴表面的库仑斥力使液滴爆炸^[5], 产生的小带电液滴继续此过程。随着液滴的水分子逐渐蒸发, 就可获得自由徘徊的质子化和去质子化的蛋白分子; 软激光解吸是指从激光脉冲中获得能量后, 样品蛋白分子以完整的低电荷分子离子释放。而后质谱仪通过加速电场测定离子化蛋白分子的质荷比便可得到蛋白分子量信息。目前占主导的方法是基质辅助激光解吸电离。这一方法是将样品掺入一种低分子量的结晶基质, 基质的最大吸

* 收稿日期: 2006 - 09 - 28; 修改日期: 2006 - 12 - 30

* 基金项目: 西北农林科技大学人才基金资助项目(2006)

作者简介: 朱 杰(1980-), 男(土家族), 湖南张家界人, 博士, 助教, 从事农业环境生物物理、分子生物物理与理论生物物理的研究; E-mail: jiessiezhu@nwsuaf.edu.cn

收与激光脉冲波长匹配,其产生的是低电荷的完整气相大分子,可检测纯度不高的生物分子。基质辅助激光解吸电离与飞行时间联合已经成为鉴定蛋白组分不可或缺的研究手段^[6,7]。

叶绿体 H^+ -ATP 合成酶是高等植物和绿藻能量供给的关键器件,经证实,其亚基 III 的低聚体在引导电化学质子梯度向旋转运动的转化中起主要作用,但有关质子转运与旋转运动的化学计量是否受有机体新陈代谢状态的影响及不同物种之间的异同在学术界还未取得一致意见。Jurgen 等^[8]用基质辅助激光解吸电离-飞行时间联用研究了菠菜、绿藻和 *C. reinhardtii* 叶绿体亚基 III 的理化特性。他们将亚基 III 的低聚体以 0.15 mg/ml 的终浓度溶于 DDM(含有 75%左右的 4,4'-二氨基二苯基甲烷和 25%左右的多苯基多氨基甲烷的混合物)作为测试样品,同时将溶于 50%氰化甲烷/0.1%三氟乙酸的饱和 2-苯甲酰胺作为制备干燥蛋白带电微粒的靶基质,并用线性-延时提取模式获得质谱。研究发现,*C. reinhardtii* 的亚基 III 没有被遗传翻译后修饰,同时质谱数据也表明绿藻 ATP 合成酶亚基 III 的化学计量与其它高等植物有一定的分歧。进一步的质谱分析发现,对亚基 III 的低聚体进行热处理或丙酮处理都会导致低聚体分解成单聚体。其中,*C. reinhardtii* 的亚基 III 的质荷比 8 125 与氨基酸序列的计算值 8 120Da 有很好的相关性,菠菜的亚基 III 的质荷比 8 003 与理论值 8 002Da 则具有更好的统一性;而亚基单体在分子量上的区别主要是由菠菜和 *C. reinhardtii* 的不同蛋白多肽链长决定的^[9]。

3 光谱技术

3.1 红外光谱技术

红外光谱(IR)能提供分子的近程结构、分子链构象、链间相互作用及链的取向状态和参数等信息,因而在蛋白结构研究中发挥着重要作用。蛋白二级结构的酰胺 I 带、II 带伸缩振动在红外光谱图谱上表现为特征性的吸收峰。傅立叶自卷积和二阶导数光谱的应用大大提高了 IR 的分辨率,从而能有效地用于蛋白变性和化学修饰、配基结合及氨基酸残基替换所引起的微小构象变化的分析。和其他方法相比,傅立叶变换红外光谱法(FT-IR)不受分子量大小、光散射的影响,适于研究生理状态下的

蛋白结构^[4]。Ansgar 等^[10]利用 FT-IR 证实了高纯化的菠菜叶绿体 ATP 合成酶亚基 III α -螺旋二级结构的存在;当亚基 III 的单聚体经十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)可溶性层析柱洗脱时,该蛋白的构象会发生大的改变,但在相同条件下的低聚体构象却没有改变,这也反映出亚基 III 在高级聚集状态有更高的稳定性。在没有 Mg^{2+} 离子存在,且 ADP 和 AMP-PNP 处于饱和状态条件下,Giovanna 等^[11]用 FT-IR 分别研究了蛋白抑制剂二环己基碳二亚胺(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide,简称 DCCD)和 Nbf-Cl 对 F₁-ATPase 的影响。结果显示,上述处理不破坏酶的二级结构,但却改变了酶结构的紧密性和热稳定性;其中 Nbf-Cl 处理明显增加了酶的热稳定性,而 DCCD 的影响则较小;相应的高效液相色谱分析显示,不论是在催化位点还是在非催化位点,DCCD 对 ADP 和 AMP-PNP 交换率的影响皆不明显;而 Nbf-Cl 则能选择性地降低紧密结合催化位点处 ADP 交换的酶化学能力。这也显示了 DCCD 的作用是与 Mg^{2+} 的存在息息相关的。

3.2 紫外光谱技术

蛋白的结构单元是 α 氨基酸,常见的 20 种 α 氨基酸中只有芳香族氨基酸,如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和含硫氨基酸,在 230—310 nm 波长范围内有吸收,因此利用紫外光谱法可以考察芳香族氨基酸的残基在蛋白分子中的位置、环境及数量,以及在物理和化学因素的影响下,蛋白二、三级结构的变化。蛋白的紫外吸收光谱中,一般 210 nm 处的峰是肽键的强吸收峰,280 nm 处的峰是酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸残基中共轭双键的吸收峰。若小分子配体与生物大分子结合前后的吸收光谱有一定差异时,可在不经分离的情况下用吸收光谱研究配体与蛋白分子的相互作用^[1,4]。蛋白的定量常用小分子作为光谱探针,如染料探针可用于辨别蛋白分子中氨基的状态、蛋白分子的活性区,可检测 pmol 量级的蛋白;稀土离子探针可用于研究蛋白分子与金属离子结合部位的结构类型,给出蛋白分子构象及构象动力学信息。Hans 等^[12]将新合成的光亲和性标记物 8-N₃-3-biotinyl-ATP 与嗜热菌 PS3 的 F₁-ATPase(TF1)发生反应,用以测试该标记物的有效度。标记后的 TF1 经紫外辐射会导致

非催化亚基 a 和催化亚基 b 类似物的核苷依赖性结合,这也说明了该合成物可作为一种有潜力的光亲和标记物。当此标记物与 V_1 -ATPase 反应时,却使得它标记于亚基 E,从而说明了 V_1 -ATPase 亚基 E 与 F-ATPase 亚基 g 的同源性。

4 核磁共振波谱技术

核磁共振(NMR)技术是以 MHz 电磁波作用到原子核上,使原子核吸收电磁能发生共振跃迁,从而得到 NMR 谱线。迄今为止,使用最多的 NMR 方法是 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{31}P -NMR 和 ^{19}F -NMR。NMR 可测定溶液中接近于生理状态的蛋白构象和蛋白作用的动力学过程;也可测定蛋白可变形尾部的构象,它往往与蛋白的活性功能紧密相关;通过对 NMR 谱峰的解析,人们可绘出所研究分子的三维图像,NMR 方法已发展成为研究蛋白溶液三维结构的独立方法^[13, 14]。由于生理条件下分子间的相互作用均在溶液中发生,因此利用 NMR 研究生理条件下蛋白分子的相互作用有特殊的优势^[15]。

Jones 等^[16]通过 NMR 研究了 F_0 -ATPase 亚基聚集体 c_{12} 的空间结构。结果表明, Asp61 羧基不在易受油脂双层脂酰基链影响的 c_{12} 圆柱体的表面上,而是位于 c_{12} 单聚体中以“前对后挤压”方式形成的 c 亚基的质子禁锢点上,从而免受了油脂双层的影响。而 c 亚基的载质子羧基则位于 c_{12} 单聚体上以“前对后挤压”方式形成的两个 c 亚基的质子禁锢点之间。载质子的 Asp61 被吸入亚基间并可被利用,这是因为经过可供选择的进、出口通道的质子化和去质子化作用要求有受挤压的 c 亚单元形成的旋转通路,另外还需要与不同的 a 亚基渗透膜的螺旋线进行逐步结合^[17]。其中, c_{12} 单聚环的旋转方向取决于质子是从膜的哪一侧通道进入。如果从膜的内侧通道进入,那么从 F_0 的底部看, c 亚基环是顺时针旋转的;当膜内外 pH 浓度差相反时,环向相反的方向旋转;因而可以说 c_{12} 单聚体环的旋转是靠跨膜的质子动力势推动的。Rodrigo 等^[18]用 NMR 技术研究了牛心线粒体 ATP 合成酶外周轴(peripheral stalk)上含有 76 个氨基酸残基的亚基 F_6 的结构特点。该亚基在质子电动势和催化作用间的偶联上起重要作用。游离的(纯化的)亚基 F_6 高度的柔性结构由通过一个松弛的疏水和连接在一起的两个螺旋组成。化学移位分析结果指出,亚基 F_6 在 ns—s 这

样较宽的时间范围内都有较高的柔性。Dmitriev 等^[19]将来自大肠杆菌 ATP 合成酶的高纯化亚基 a, b, c 及磷脂重组装成具有质子传输功能的聚集体,然后利用 NMR 技术研究了聚集体中的亚基 a, NMR 谱显示了较好的化学位移值,并指出此方法可解决亲脂性膜蛋白的研究难题。

5 同步辐射 X 射线衍射技术

X 射线波长小于原子间距和分子间距,但又基本在同一量级,可用于了解原子和分子的排布及其有序度等信息。X 射线衍射方法不但可以确定晶体中烃链的组合状态,而且可以确定二级结构的晶型和晶格维度,其测定分子量可大于几百万。相对于常规 X 射线源,同步辐射能产生高强度的 X 射线,在短时间内就能收集到所需的实验数据,因而不至于造成晶体损伤;同时,根据同步辐射波长可任意改变的特性,可以利用多波长反常散射技术直接确定蛋白和核酸结构中的相位参数的测定;另外,高强度的同步辐射可使微小晶体的结构分析成为可能。所以,利用同步辐射光源测定蛋白分子的结构更有优越性^[3, 4]。

自建立化学渗透学说以来,科学家们已基本阐明了把将呼吸作用和光合作用偶联起来并实现 ADP 和 Pi 合成 ATP 的跨膜电动势产生的原理,但对催化 ATP 合成的 ATP 合成酶的结构却一直未得到较为直观的特征。1994 年,Abrahams 等^[20]利用同步辐射 X 射线衍射技术,得到分辨率为 2.80 Å 的 F_1 -ATPase 晶体的三维结构,该酶呈扁球体状,高约 8 nm,宽约 10 nm,是由 3 个 α 亚基与 3 个 β 亚基按六边形交替排列而成的一个对称的桔瓣状结构,并在中心围成一凹陷, γ , ϵ 和 δ 等亚基则位于其中。晶体结构表明^[21, 22],在催化循环中, F_1 上的 3 个 β 亚基不是对称的,而是分别处于不同的构象状态。从此结构中可以从很清楚地看到, F_1 中的 3 个 β 亚基分别含有不同的核苷酸和同时具有不同的构象。为深入理解催化机制, Kerstin 等^[23]利用分辨率为 2.5 Å 的 X 射线衍射技术研究了三氟化铝和 Mg^{2+} -ADP 抑制的牛心线粒体 F_1 -ATPase 的空间结构,实验发现经处理的 F_1 -ATPase 的结构与结合 AMP-PNP 和 ADP 的原始结构稍有差别。只有当结合 ADP 的核苷结合位点结合氟化铝和 Mg^{2+} -ADP 时才会导致 α 与 β 亚基核苷结合能力的

改变,而氟化铝只在少量辅酶存在时才会起作用。很显然,核苷一旦结合于催化位点 β 亚基时,蛋白催化功能的实现并不需更多的结构改变。X射线衍射技术的发展促进了 F_1 -ATP合成酶完整空间结构的建立,并借以逐步解释了该酶的催化合成机理。Daniel等^[24]的研究得到了 F_0 -亚基c聚集体的电子密度图,该成果为深入研究该蛋白膜区部分的功能提供了较为可信的证据。

6 电子显微镜技术

Karrash等^[25]和Rubinstein等^[26]利用负染电镜技术研究了牛心线粒体ATP合成酶和在体外经抗生物素蛋白修饰的酵母菌ATP合成酶寡毒素敏感相关蛋白(Oligomer Sensitive Conferring Protein,简称OSCP)。研究发现,连接的抗生物素蛋白位于 F_1 部分,电镜图片显示OSCP的C端位于 F_1 部分的表面,而OSCP的N端则与膜上 F_0 部分亚基a的N端区域相互作用;其中OSCP沿着 F_1 表面向 F_0 拓展将近10nm,直至与其末端与亚基b的C端相连为止。而亚基h是酵母菌ATP合成酶外周轴区域的一个重要组成部分,它同牛心线粒体ATP合成酶的亚基 F_6 有较高的同源性,其中 F_6 可在酵母菌中替代亚基h并行使其功能。亚基h的C端在体内可被生物素衍生化,这便使得抗生物素蛋白可显著连接于体外纯化的酶复合体。Runswick等^[27]利用负染电镜研究了ATP合成酶——抗生物素蛋白复合体中亚基h的C端在外周轴上的位置,图像显示亚基h的C端十分靠近ATP酶的 F_0 部分。Hendrika等^[28]通过电子显微镜在六角形结构的中间还观察到了第7个区域,主要是 γ 亚基。电镜技术还发现3个 α 亚基之间的距离要比3个 β 亚基之间的距离大0.9nm,这种差别可能是由于 F_1 -ATPase分子下面部分的小亚基的存在而引起的,这些小亚基接近于膜表面,而 α 亚基在膜上的位置比 β 亚基低,因而小亚基的位置可能位于 $\alpha_3\beta_3$ 结构的中间。反过来说,这可能正是决定 α 亚基和 β 亚基位置关系的直接原因。蛋白结晶的电镜研究显示, F_0 -ATPase酶的直径为7.5nm左右,a亚基和b亚基位于c多聚体(c_{12})的外侧^[29]。其中, c_{12} 是轮

形的多聚体,可由亚基a提供的质子流驱动。亚基a位于c亚基的外边,而b亚基则处于连接a亚基和 δ 亚基的位置。在线粒体 F_1F_0 -ATPase中,其连接轴部分包括OSCP,b, F_6 ,d和 γ , δ , ϵ ;另外,亚基e,f,g的具体位置至今还不太清楚^[30]。

7 原子力显微术

原子力显微镜(Atomic Force Microscope,简称AFM)是新颖且有效的显微操纵工具,在nm范围内,它对生物过程的研究起着非常重要的作用。它可以在分子水平上进行力测量和力操纵,得到表面形貌,还可研究样品的粘弹性、电荷和磁畴分布等物理特性。AFM在生物大分子结构研究中具有明显优势,可在空气或者在接近生理条件下进行直接观测,这是其它化学和物理分析方法所无法比拟的。通过控制成像力的大小,采用合适的成像模式不会引起样品分子的漂移和损坏,图像的可重复性较高;现场操作性好,能够研究监测整个生化反应的动力学过程^[31,32]。AFM的出现为ATP合成酶结构的认识提供了广阔的空间。ATP合成酶能在脂膜上形成二维晶阵,适于用AFM研究。高信噪比的AFM可以直接对膜上ATP合成酶在分辨率nm级时清晰成像,还可使ATP合成酶在接近生理状态的溶液中成像,成像分辨率可达到0.1nm。Müller等^[33-35],Meier等^[36]和Seelert等^[37]利用AFM在溶液中对磷脂膜组装的大肠杆菌和叶绿体ATP合成酶的 F_0 部分进行了研究,从清晰的原子力显微图像可见c亚基的个数分别为11和14,这对理论上的12个c亚基的模型提出了挑战。目前的研究显示,重组成F型ATP合成酶离子转运转子的亚基c数目依赖于生物进化的差异性。Müller等的系列研究发现,对于同一物种而言,无论是完整转子还是有缺陷的转子都会有同一半径,这暗示了转子半径与亚基化学计量决定于亚基的外形及其外周相邻的相互作用。Thomas等^[38]将纯化的细菌(*Ilyobacter tartaricus*)ATP合成酶的轮状转子部分重组成二维晶阵,AFM图像显示,轮状转子的中心部位有一塞子样的凸起物(Plug Protruding)。当将蛋白质置于磷脂酶C中培养时,塞子样的凸起

物会消失,但外周的亚基 c 聚合体却不受影响。这一现象表明,凸起物主要由磷脂组成,而外周经离子去垢剂纯化的 c 环则基本上没有磷脂,它们主要在重组过程中形成中空的轮状结构。

8 荧光共振能量转移

一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体-受体对,而偶极相互作用则会将激发供体分子的光子能量传递至受体,而后受体通过发出光子而弛豫,这就是荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transform,简称 FRET)理论。能量传递的效率和供体的发射光谱与受体的吸收光谱的重叠程度、供体与受体的跃迁偶极的相对取向、供体与受体之间的距离等有关^[4]。由于发生 FRET 将改变供体的去偏振程度、荧光寿命及荧光强度,而能量受体也有相应参数的变化,测定这些参数值就可以得出能量传递效率。利用时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)可测定供体荧光强度随时间衰减的动力学曲线 $I(t)$,并由此得到供-受体距离分布函数 $F(r)$ 。FRET 技术可以分析生物大分子三维结构及特定位点间的距离,研究大分子内部波动、多亚基蛋白的装配或直接测量分子的大小。

Steigmiller 等^[39]为了观察酶反应底物在 ATP 合成酶上的结合状态,将荧光供体 TMR 选择性地标记于大肠杆菌 ATP 合成酶亚基 g 的 T106C 位置;经标记的酶可通过脂质体重组技术组装成可催化 ATP 合成的复合体结构;然后将底物 ATP-Alexa Fluor 647(S647)作为受体用于研究分子间的 FRET。在分子检测中发现,根据分子间不同 FRET 效率,酶上结合的 S647 有 5 个清晰可辨的稳定态。这一实验现象暗示了 S647 在酶上存在不同的结合位点。另外,随着过量 ATP 的连续水解也会导致 FRET 效率的逐步改变。由此可见,亚基 g 在催化过程中的运动直接受控于荧光受体 S647 在酶上的结合位点。在线粒体 ATP 合成酶(mt-ATPase)催化 ATP 合成或水解的过程中,定子能有效地阻止 F_1 催化部位的无效转动。尽管人们一般认为 mt-ATPase 的外周轴足以抵挡转子旋转时产生的力矩,但到目前为止人们还未找到这一观点的直接证据。Paul 等^[40]用 FRET 对 OSCP 和亚基 b 与外周轴的相互作用进行了研究。他们用不同含量的天冬酰胺酸(G166N)对天然 OSCP 的 C 端进行

置换并形成了亚稳态的复合物;研究发现,相对于含有天然 OSCP 的酶复合体,包含 G166N 复合体的 FRET 效率明显下降,这直接表征着 ATP 合成酶 ATP 水解活性的降低。他们考虑了 OSCP 和亚基 b 在阻止 F_1 无效转动的效果后认为 OSCP 和亚基 b 可作为定子的一部分。

9 结论

上述技术与方法是研究 ATP 合成酶结构的基本手段,它们都有各自的长处和局限性。质谱可较为精确地了解蛋白分子的种类和分子修饰及分子间的相互作用,但对分子的空间构象却无能为力;NMR 与 X 射线衍射技术可从不同的侧面描述分子结构,是研究分子空间构象的有力手段,但对某些蛋白它们无法给出相同的结果,但其解谱过程需要较强的专业知识和繁琐的数学处理,不利于普及;各种光谱技术能详细地给出蛋白多肽链的状态,但这些谱学方法却无法给出直观的结构表征^[2, 3];电子显微镜技术则可给出直观的物体表面图像及物质密度分布情况,但其制备样品的过程十分繁琐,而且也无法在近生理状态下进行观察,很难反映样品的真实状态。

FRET 技术对蛋白分子结构的分析是在溶液中进行的,无需复杂的结晶等样品处理步骤,因而快速、灵敏,其测定结果不仅能反映蛋白分子结构与功能间的关系,更能体现蛋白反应的动态过程,这是 X 射线晶体学和电镜技术等所不能解决的问题,其难题在于荧光探针的制备。而 AFM 不仅拥有原子级的高分辨率,还可以观察活的生命样品,同时也能够对样品进行力行为加工,这些独特的特性使 AFM 在单分子研究中占据着独特的地位。AFM 能给出直观的蛋白图像;对单个蛋白分子的操纵,可以得到分子水平上的许多有用的信息。利用单分子力谱技术可研究蛋白分子折叠和解折叠的过程;但到目前为止,AFM 的特异识别功能还有相当的局限性。若要全面了解蛋白分子的结构和性能,单一技术手段是无法完成的,而必须依赖于多种仪器的综合使用。

参考文献(References):

[1] Wang Qinda, Lin Qishui. Progress in Biochemistry and Bio-

- physics, 1996, **23** (3): 213(in Chinese).
(王庆达, 林其谁. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(3): 213.)
- [2] Zhu Jie. Jishou Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban). 2005, **26** (2): 24(in Chinese).
(朱 杰. 吉首大学学报(自然科学版); 2005, **26**(2): 24.)
- [3] Sun Runguang, Zhang Jing. Chemical Journal on Internet, 2003, **5**(8): 61.
- [4] Yasuo Kagawa. Adv Biophys, 1999, **36**: 1.
- [5] Fenn J B, Enn M N, Eng C K, *et al.* Science, 1989, **246** (4562): 64.
- [6] Tanaka K, Waki H Ido Y, Akita S *et al.* Rapid Gamrnm Mass Spectrom, 1988, **2**: 151.
- [7] Kurt W Nobel Mesuem, Chemical Nobel Lecture, 2002, 1.
- [8] Jurgen M, Meyer Z, Sasch R, *et al.* Biochimica et Biophysica Acta, 2004, **1 659**: 92.
- [9] Rexroth S, Meyer Z T, Sasch R, *et al.* Electrophoresis, 2003, **24**: 2 814.
- [10] Ansgar P, Sasch R, Joachim H, *et al.* Biochimica et Biophysica Acta, 2003, **1 618**: 59.
- [11] Giovanna L, Fabio T, Francesca D, *et al.* FEBS Letters, 1998, **432**: 128.
- [12] Hans J S, Uonal C, Olaf E, *et al.* BBRC, 2001, **286**: 1 218.
- [13] Fiaux J, Bertelsen E B, Horwich A L, *et al.* Nature, 2002, **418**: 207.
- [14] Fu D, Lobs on A, Ylierke L J, *et al.* Science, 2000, **290** (5 491): 481.
- [15] Doyle D, Cabral J, Pfuetzner R, *et al.* Science, 1998, **280** (5 360): 69.
- [16] Ignacio A, Phil C J. Nature, 1999, **R1**: 117.
- [17] Paul D B. FEBS Letters, 2002, **512** : 29.
- [18] Rodrigo J C, Jocelyn A S, Michael J R, *et al.* J Mol Biol, 2004, **342**: 593.
- [19] Dmitriev O Y, Karlheinz A, Fillingame R H. FEBS Letters, 2004, **556**: 35.
- [20] Abrahams J P, Leslie A G, Lutter R, *et al.* Nature, 1994, **370**: 621.
- [21] Lambright D G, Sondek J, Bohm A, *et al.* Nature, 1996, **379**: 311.
- [22] Jiang Y, Lee A, Chen J, *et al.* Nature, 2002, **417**: 515.
- [23] Kerstin B, Menz R I, Martin G M, *et al.* Structure, 2000, **8**: 567.
- [24] Daniel S, Clyde G, Ignacio A, *et al.* Current Opinion in Structural Biology, 2000, **10**: 672.
- [25] Karrasch S, Walker J E. J Mol Biol, 1999, **290**: 379.
- [26] Rubinstein J L, Walker J E. J Mol Biol, 2002, **321**: 613.
- [27] Rubinstein J L, Dickson V K, Runswick M J, *et al.* J Mol Biol, 2005, **345**: 513.
- [28] Hendrika S, Van Walraven, Heinrich S. FEBS Letters, 1996, **379**: 30.
- [29] Christopher A P, Nicholas A D. Experimental Eye Research, 2004, **78**: 699.
- [30] Joachim W, Alan E S. FEBS Letters, 2003, **545**: 61.
- [31] Zhu Jie. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, **34** (5): 735(in Chinese).
(朱 杰. 分析化学, 2006, **34**(5): 735.)
- [32] Zhu Jie. Life Science Instrument, 2005, **3**(2): 22(in Chinese).
(朱 杰. 生命科学仪器, 2005, **3**(2): 22.)
- [33] Müller D J, Heymann J, Oesterhelt B F, *et al.* Biochemical Biophysical Acta, 2000, **79**(1 460): 27.
- [34] Müller D J, Engel A, Meier T, *et al.* Journal of Molecular Biology, 2003, **327**: 925.
- [35] Müller D J, Norbert A D, Thomas M, FEBS Letters, 2001, **504**: 219.
- [36] Meier T, Matthey U, Henzen F, *et al.* FEBS Letters, 2001, **505**: 353.
- [37] Seelert H, Norbert A D, Muller D J. J Mol Biol, 2003, **333**: 337.
- [38] Thomas M, Ulrich M, Fabienne H, *et al.* FEBS Letters, 2001, **505**: 353.
- [39] Steigmiller S, Zimmermann B, Diez M, *et al.* Bioelectrochemistry, 2004, **63**: 79.
- [40] Paul D G, Rodney J D, Mark P. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, **1 607**: 167.

Applications of New Biophysical Techniques to Supramolecular Structure of ATP Synthase*

ZHU Jie¹⁾, WANG Guo-dong

(College of Science, Northwest A & F University, Yangling, 712100, Shanxi, China)

Abstract: The developing modern physical techniques offer a series of abundant and effective methods to study ATP synthase in structure and function. Firstly we stressed on the dialectic relationship between physical techniques and the improvement of science in history, and introduced a lot of physical techniques in common use in protein researches such as mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance, synchronization X-ray diffraction, infrared spectroscopy and ultraviolet spectroscopy, and then reviewed their application status in quo to ATP synthase. Secondly we paid our attention to the burgeoning unconventionally instruments, i. e., the atomic force microscope and the fluorescence resonance energy transform (FRET) which have attracted the professional attention, and introduced latest application and researches' achievements. Compared the development of the techniques in recent years, we have set forth the shortcoming and excellence of all kinds of equipments introduced. And it was ended with the conclusion that it is necessary to manage the possible instruments effectively and sufficient for the personalities, and given out the optimum research routes which emphasized on the new techniques and novel methods, i. e., the atomic force microscope and FRET.

Key words: new biophysical technique; ATP synthase; supramolecular structure

* Received date: 28 Sep. 2006; Revised date: 30 Dec. 2006

* Foundation item: Northwest A & F University(2006)

1) E-mail: jiessiezhu@nwsuaf.edu.cn