

用 N-3 苾 NEM 标记巯基研究高铁卟啉化合物对红细胞膜蛋白的影响

许彩民 靳 艳 吴元德 潘华珍

(中国协和医科大学基础部)

提 要

N-(3 苾)马来酰亚胺(N-3 苾 NEM)是一种特异标记蛋白质巯基的荧光探针,可通过荧光强度测定巯基含量。本文用不同浓度的高铁卟啉处理红细胞膜,再用 N-3 苾 NEM 标记,发现随浓度加大,巯基含量减少,与化学法测定结果一致,说明高铁卟啉可使膜蛋白巯基交联。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法做 N-3 苾 NEM 标记的红细胞膜,通过荧光扫描确定 N-3 苾 NEM 与红细胞膜区带 1、2 及 3 结合。

N-(3 苾)马来酰亚胺(N-3 苾 NEM)在水溶液中无荧光,它与带有巯基的蛋白质或有机化合物结合后即产生荧光。此物质是特异标记蛋白质巯基的一种荧光探针。可通过荧光强度测定巯基含量^[1]。

我们过去的工作曾证实^[2],某些溶血病产生溶血的原因之一是红细胞中脂质过氧化,产生溶血物质使细胞破溶。经质谱、色谱等多种方法分析鉴定,此溶血物质是高铁卟啉类化合物。

本文进一步研究了高铁卟啉类化合物对红细胞膜(ghost)蛋白的影响,特别是对巯基的作用,因为巯基是较敏感的基团,又与多种功能有关,故可以用 N-3 苾 NEM 荧光探针观察膜巯基的改变,以探讨溶血机理。

一、材料与方法

1. 材料

红细胞取自正常人静脉血。

马来酰亚胺、N-(3 苾)马来酰亚胺,均为 Sigma 公司产品。其他均为国产试剂。

2. 高铁卟啉化合物的制备

取 0.2ml 洗涤的正常人红细胞,加入丙二醛(终浓度为 10mM)搅匀,37℃ 保温 1 小时。然

后按 Rose^[3]法提取膜脂质,再用氮气吹去溶剂,加甲醇溶解,做薄层层析,在层析板前沿有棕色点,将棕色点刮下溶于甲醇,在 398nm 处测其光密度,以光密度值(O. D)代表其浓度。

3. N-3 苾 NEM 荧光探针标记红细胞膜

分别取 O. D 为 0.1, 0.5, 1.0 及 2.0 高铁卟啉化合物 0.5ml,用氮气吹干,加 50 μ l 甲醇溶解,然后分别加入 2mg 蛋白/ml 的红细胞膜 0.5ml,加 0.5mg% 的 N-3 苾 NEM 2ml,以不加高铁卟啉化合物的红细胞膜为对照,37℃ 保温 2 小时,保温后用 Hepes 缓冲液洗 2 次,在日立 850 荧光分光光度计上扫描。

4. 红细胞膜巯基的测定

分别取 O. D 0.5 及 1.0 高铁卟啉类化合物 0.5ml,氮气吹干,加 50 μ l 甲醇溶解后,加入洗过的压积红细胞 1ml,37℃ 保温一小时,用生理盐水洗两次,按 Dodge^[4]法制备红细胞膜。蛋白含量按 Lowry^[5]法测定。按荣康泰^[6]法加 5, 5'-二硫对硝基苯甲酸(DTNB)显色,在 412 nm 波长比色,测膜总巯基含量。

5. N-3 苾 NEM 标记的红细胞膜,做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

本文由中国科学院基金资助

用 N-3 苾 NEM 标记红细胞膜,方法步骤同 3。标记后用磷酸缓冲液洗两次,电泳按 Fairbank^[7] 法进行。电泳结束后,先进行荧光扫描,再用考马氏亮蓝染色,找出与荧光对应的膜蛋白部位。

结果与讨论

高铁卟啉类化合物对红细胞膜巯基影响见图 1。从图 1 可以明确看出随着高铁卟啉化合物加入量的增多,巯基明显减少。当高铁卟啉化合物浓度高于 O. D 1.0 以上时,巯基量不再有明显变化。据推测高铁卟啉化合物可使膜蛋白的巯基氧化成二硫键,从而改变了膜蛋白的结构和功能。当高铁卟啉化合物的浓度大于 1, 则因膜上巯基几乎全都被氧化,故再增加高铁卟啉化合物的浓度,膜上巯基被氧化的量不

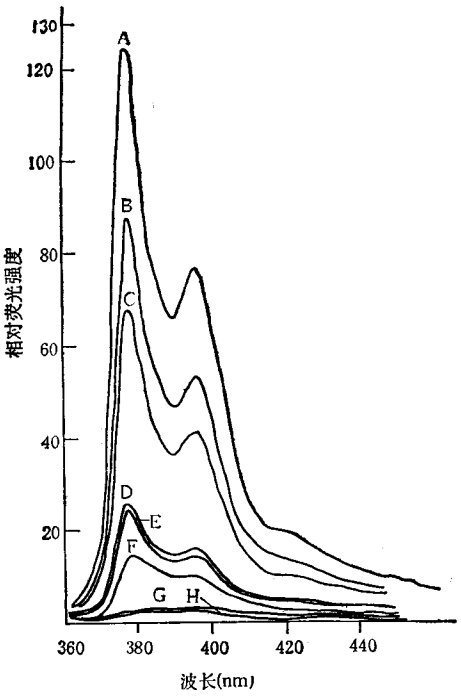


图 1 高铁卟啉类化合物处理红细胞膜后,用 N-3 苾 NEM 标记的荧光扫描图

- A. 0.5ml 红细胞膜+2ml N-3 苾 NEM
- B. 0.5ml 红细胞膜+2ml N-3 苾+NEM+O.D0.1 高铁卟啉
- C. 0.5ml 红细胞膜+2ml N-3 苾+NEM+O.D0.5 高铁卟啉
- D. 0.5ml 红细胞膜+2ml N-3 苾+NEM+O.D1.0 高铁卟啉
- E. 0.5ml 红细胞膜+2ml N-3 苾+NEM+O.D2.0 高铁卟啉
- F. 0.5ml 红细胞膜+2ml NEM + N-3 苾 NEM
- G. 0.5ml 红细胞膜+2ml Hepes 缓冲液 + NEM
- H. 0.5ml 红细胞膜+2ml Hepes 缓冲液

表 1 不同浓度高铁卟啉类化合物处理红细胞后膜总巯基量的变化

处理前 (nmol-SH/mg 蛋白)	处理后	
	O.D 0.5 (nmol-SH/mg 蛋白)	O.D 1.0 (nmol-SH/mg 蛋白)
92.1 ± 2.21	84.7 ± 2.97	74.6 ± 2.46

以上数据为三次实验平均值

再增加。表 1 列出不同浓度高铁卟啉类化合物处理红细胞膜后总巯基量的变化。

为了进一步证明 N-3 苾 NEM 荧光探针确实标记在红细胞膜巯基上,我们先用巯基的抑制剂 N-乙酰马来酰亚胺与红细胞膜 37℃ 保温一小时,封闭红细胞膜上的巯基,保温结束后用磷酸缓冲液洗三次,再用 N-3 苾 NEM 结合,反应条件同方法 3,结果见图 1F 曲线。从结果看出用 NEM 封闭后即巯基不再与 N-3 苾 NEM 结合,证明 N-3 苾 NEM 确实标记在红细胞膜巯基上。

通过前面两个指标的分析,可确定红细胞

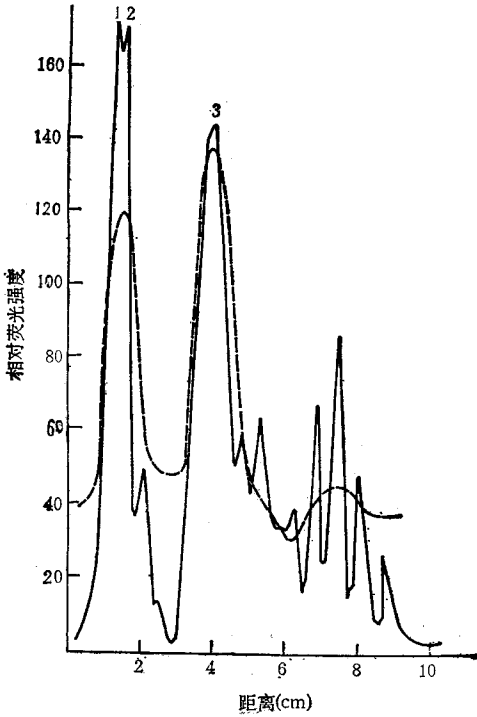


图 2 N-(3 苾) NEM 标记红细胞膜, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱及荧光扫描图谱
—— SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱
---- 荧光扫描图谱

呼吸链电子传递与线粒体内膜流动性

冯元怡 程德基 林克椿

(北京医科大学, 生物物理教研室)

提 要

本文报告用稳态荧光各向异性研究呼吸链底物氧化启动电子传递时线粒体内膜的流动性变化。结果表明呼吸链底物使内膜流动性增大, 磷脂分子脂酰链的活动度增加(从 2 位碳到 12 位碳)。FCCP (p-trifluoromethoxycarbonylcyanide phenylhydrazine) 取消 H^+ 梯度时底物仍可使内膜流动性增加, 提示流动性的增加与底物氧化启动的电子沿呼吸链的传递过程密切相关。

生物膜的流动性对许多与膜相关的功能活动的调节具有重要意义。在线粒体内膜, 电子传递过程与呼吸链成分的运动密切相关^[1]。膜蛋白的运动依赖膜脂的流动性, 因此研究电子沿呼吸链传递时内膜磷脂分子的动力学特征对于了解氧化磷酸化过程的实现是十分重要的。我们已报道呼吸链底物和抑制剂对线粒体内膜流动性的影响^[2]。本文进一步研究在底物作用下线粒体内膜流动性变化在脂双层不同深度的表现以及在解偶联剂取消 H^+ 梯度时加入底物对内膜流动性的影响。

膜上含有带巯基的蛋白, 为了确定巯基蛋白部位, 用 N-3 苣 NEM 标记的红细胞膜进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳扫描图谱见图 2, 从图 2 中可见, N-3 苣 NEM 结合在区带 1、2 及 3 的部位上。区带 1, 2 是红细胞膜收缩蛋白, 也是膜骨架的主要组成成份, 对维持细胞膜形态起重要作用。在区带 3 有血型糖蛋白、阴离子通道及乙酰胆碱脂酶等。Robert 等人^[8]用汞试剂——对二氯汞苯磺酸封闭巯基后, K^+ 渗透性增加, 溶血度明显增高, 这也证明溶血与巯基有关。巯基在膜上的作用是多方面的, 涉及到酶的活性、膜的通透性等, 故用高铁卟啉氧化膜上巯基可直接影响膜的结构与功能, 最终造

材 料 与 方 法

1. 试剂 DPH (1, 6-Diphenyl 1, 3, 5-hexatriene)、TMPD (N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine)、FCCP、HEPES 均系 Sigma 产品, 2-, 6-, 9-, 12-(9-蒎甲酰)硬脂酸 (2-, 6-, 9-, 12-AS) 系 molecular probes 产品。毛地黄皂苷系杭州第一制药厂产品。其余试剂均系北京化工厂产品。

2. 线粒体内膜的制备 据参考文献 [3] 所述方法自大鼠肝脏提取线粒体, 再用毛地黄皂

成膜破溶。

参 考 文 献

- [1] Joel, K. et al.: *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3173, 1973.
- [2] 潘华珍等: 《生物化学与生物物理进展》, 2, 34, 1984.
- [3] Rose, H. G.: *Journal lipid Research*, 6, 528, 1965.
- [4] Dodge, Z. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [5] Lowry, O. H.: *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265, 1951.
- [6] 荣康泰: 未发表资料。
- [7] Fairbanks, G.: *Biochemistry*, 10, 2606, 1971.
- [8] Robert, M.: *Journal of physiology*, 69, 185, 1967.

[本文于 1986 年 8 月 1 日收到]