

研究报告

脂对泛醌细胞色素 c 还原酶的影响

张亦昕 尚贺勇 徐建兴

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用羟基磷灰石柱亲和层析法制备了高纯度的缺脂泛醌细胞色素 c 还原酶. 脂的缺失使该酶活力丢失, 部分细胞色素 (约 52.8% 细胞色素 b 和 82.5% 细胞色素 c_1) 呈现还原状态. 将缺脂泛醌细胞色素 c 还原酶与磷脂重组, 可恢复其活性, 同时那些呈还原状态的细胞色素也恢复到氧化态. 此结果表明如此制备的缺脂泛醌细胞色素 c 还原酶仍保持着活力所必需的构象状态, 细胞色素氧化还原状态随脂缺失的变化反映了脂与蛋白的相互作用.

关键词 泛醌细胞色素 c 还原酶, 磷脂重组, 蛋白构象

泛醌细胞色素 c 还原酶 (ubiquinone-cytochrome c reductase), 又称复合物 III (complex III) 或 bc_1 复合物 (bc_1 complex), 位于线粒体内膜呼吸链酶系的中段. 它是个疏水性极强的跨膜蛋白, 分子量为 250 000, 含 9~11 个亚基, 其中直接参与电子传递的有细胞色素 b_{562} 、 b_{566} 、 c_1 、Fe-S 中心和泛醌^[1]. 此酶催化电子从还原型泛醌向氧化型细胞色素 c 的传递, 在传递电子的同时按照 Mitchell 提出的泛醌循环机制^[2]将 H^+ 从基质侧转运到胞浆侧. 鉴于泛醌循环机制在 Mitchell 的化学渗透学说中的重要地位, 自 1978 年 Mitchell 获得诺贝尔奖之后, 泛醌在能量转化机制中的作用方式即刻成为引人注目的课题. 尽管有相当的实验证据支持泛醌循环机制, 但是泛醌分子长长的异戊二烯侧链 (长度相当于膜脂双分子层的厚度), 使它很难适合泛醌循环机制要求的自由而迅速的跨膜运动^[3]. 应运而生的泛醌结合蛋白理论对泛醌的作用方式提出了一个全新的解释^[4,5]. 由此可见, 这个酶是研究能量偶联机制的重要模型, 从 1962 年 Hatefi 实验室首次提纯这个酶之后, 许多实验室用不同的方法改进了酶的提纯度, 并对该酶的结构进行了大

量的研究. 但涉及到精确地解释酶的结构与功能的关系时, 晶体结构的知识就显得特别重要. 1981 年用电镜方法得到了该酶 2.5 nm 二维结构^[6]. 近年来不少实验室开始了三维 X 晶体结构的研究^[7], 但分辨率都不太高.

为了得到高纯度的酶进行晶体培养, 我们参照 Yu 的方法^[8]在 pH 8.0 条件下用磷酸钙凝胶吸附法制备泛醌细胞色素 c 还原酶. 此方法在洗涤杂蛋白过程中, 洗涤液中的去垢剂可以把酶中的磷脂和脂溶性泛醌交换出来. 所以, 虽然制备的酶纯度高但酶活力却因脂和醌的丢失而降低. 本文报道了如此制备的低活力酶的特性及其与脂重组恢复活力的特征.

1 材料与方法

1.1 化学试剂

细胞色素 c, 磷脂酰胆碱 (PC), 磷脂酰乙醇胺 (PE), 心磷脂 (CL) 均购自 Sigma 公司. 琥珀酸钠购自 Aldrich 公司. 大豆磷脂购自 Fluka 公司. 磷酸钙凝胶为上海东风试剂公司产品. Q_{OC10} (一种泛醌的类似物, 可作为泛醌细胞色素 c 还原酶的底物) 由古练权教授

合成并赠送。其余试剂为北京化工厂分析纯产品。

1.2 酶的制备

心肌制剂和琥珀酸细胞色素c还原酶的制备参照文献[9]，以猪心肌肉为材料。泛醌细胞色素c还原酶参照文献[8]从琥珀酸细胞色素c还原酶制备，磷酸钙凝胶柱(2.5 cm×1.6 cm)预先用pH 8.0的平衡液(50 mmol/L Tris-琥珀酸含0.5%的TritonX-100和30 mmol/L K₂HPO₄)平衡。琥珀酸细胞色素c还原酶10 g/L于反应液(pH 8.0的Tris-琥珀酸缓冲液20 mmol/L含1% TritonX-100)中，在冰浴条件下搅拌60 min。将3 ml反应液处理的琥珀酸细胞色素c还原酶加到平衡好的磷酸钙凝胶柱上，红色的泛醌细胞色素c还原酶吸附在柱上，其他成分随缓冲液流出。用3个柱体积冰浴预冷的淋洗液(50 mmol/L pH 8.0的Tris-琥珀酸缓冲液，内含0.5%的胆酸钠，10%甘油和30 mmol/L K₂HPO₄)液洗去杂蛋白后，再用预冷的洗脱液(50 mmol/L pH 8.0的Tris-琥珀酸含0.2 mol/L K₂HPO₄和10%甘油)将吸附的泛醌细胞色素c还原酶洗脱下来。

1.3 酶活力的测定

测活体系为0.1 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液，0.3 mmol/L EDTA和0.1 mmol/L细胞色素c。于25℃预温后，加30 mmol/L的还原型Q_{OC10}和0.5 μg酶蛋白启动反应。在550 nm监测细胞色素c还原速率，用消光系数18.5 mmol⁻¹·cm⁻¹计算，酶活力单位为单位酶量单位时间内还原细胞色素c的微摩尔数(μmol·min⁻¹·mg⁻¹)。

1.4 酶与磷脂的重组

大豆磷脂配成10 g/L，于冰浴中在吹氮气气氛下超声至均一悬液封存待用。PC、PE和CL经真空干燥后，于吹氮除氧的50 mmol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液(内含0.5%胆酸钠)中制成均一溶液封存待用。将泛醌细胞色素c还原酶与上述磷脂溶液按指定比例混合于冰浴中保温20 min测活。

1.5 光谱扫描测定

在岛津UV-250分光光度计上扫描500~630 nm，酶样品溶于含0.2%胆酸钠的50 mmol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液中。

2 结果和讨论

2.1 酶与大豆磷脂的重组

泛醌细胞色素c还原酶是一个含脂蛋白，含约14%质量比的磷脂是酶活性必需的。羟基磷灰石柱亲和层析法制备泛醌细胞色素c还原酶时，由于淋洗液中含有去垢剂，在洗去杂蛋白的同时也把酶中的脂洗掉了一部分。而且，脂溶性的泛醌也随脂的丢失而丢失。因此，此法制备的泛醌细胞色素c还原酶是活力较低的酶，通常只有原活力的1/20~1/30。用于本实验的酶活仅为2.9 μmol/(min·mg)，将大豆磷脂重组到低活力的泛醌细胞色素c还原酶中可使一部分活力得到恢复，如图1所示。当每毫克蛋白中加入磷脂0.5~0.7 mg时，活力恢复达最大值32 μmol/(min·mg)。此重组活力约为该酶正常活力的一半，这是因为重组酶中还缺少泛醌的缘故，如把泛醌也重组进去活力可大部分恢复。本文将不涉及泛醌的重组，只讨论脂的重组性质。至于为什么在高脂浓度下活力反而下降，还有待研究。

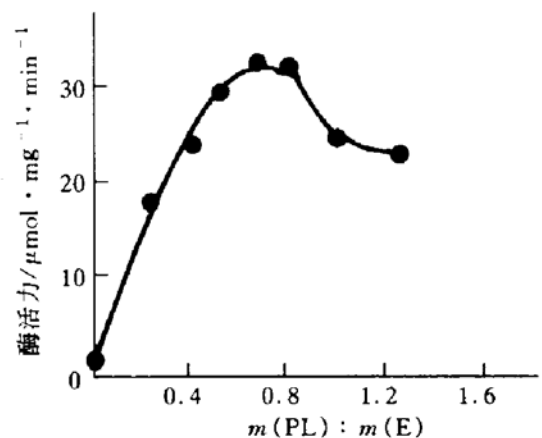


图1 低活力泛醌细胞色素c还原酶与大豆磷脂的重组活性

2.2 泛醌细胞色素c还原酶与纯磷脂重组

如果以单纯的磷脂代替复合的大豆磷脂进

行重组, 则发现不同磷脂对重组活力的恢复表现不同的特点. 如图 2 所示. PE 的重组表现为钟罩形曲线, 在 PE 浓度为 1.2 mg 每 mg 蛋白时有最大值. PC 的重组活力随脂加入量的增加而增加, CL 则表现对重组活力影响不大. 这种不同的重组行为可能与酶制备时不同脂丢失程度不同有关. 表 1 是用胆酸钠加硫酸铵沉淀法^[10]将酶中的脂逐步抽提的过程, 三种脂丢失的速率顺序为 PC>PE>CL. 也与酶对不同脂的依赖性不同有关. 任何单一脂均不能使活力恢复到复合的大豆磷脂的重组活力. 显然一个恰当的各种脂的比例是重要的.

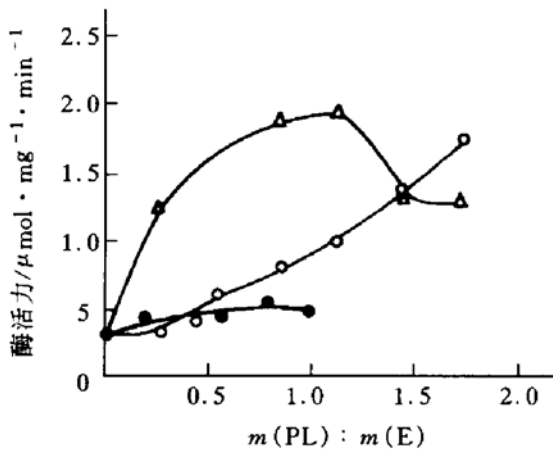


图 2 低活力泛醌细胞色素 c 还原酶与单一磷脂的重组活性

表 1 不同磷脂的去除程度

去除次数	去除磷脂的百分率/%		
	PC	PE	CL
1	83	69	70
2	90	89	84
3	95	95	83

2.3 脂对蛋白光谱性质的影响

通常制备的泛醌细胞色素 c 还原酶含约 14% (重量比) 的磷脂^[11], 这些脂是酶活力所必需的. 这些制备的丢失不仅使酶活力下降而且也影响蛋白的结构性质. 从光谱扫描结果看, 低活力的泛醌细胞色素 c 还原酶中的细胞色素 b 和 c₁ 均表现出部分还原状态, 如图 3 (a) 可看到两个明显的峰: 551.5 nm 是细胞

色素 c₁ (cyt_{c1}), 562 nm 是细胞色素 b (cytb). 计算约 53% 的细胞色素 b 和 83% 的细胞色素 c₁ 已处于还原态. 重组磷脂后, 细胞色素的状态也随重组脂的增加而逐步恢复到正常的氧化状态, 如图 3b~图 3h 所示. 重组脂的这种作用经检查不象是代入了氧化剂的缘故, 因所用大豆磷脂并不引起正常不缺脂的还原型泛醌细胞色素 c 还原酶中细胞色素的氧化. 一种可能是脂和蛋白之间存在某种相互作用, 脂的缺失使这种作用减弱从而改变了蛋白的构象状态, 而导致氧化还原电位的改变. 再有一种可能是脂和细胞色素之间可能有电子交换, 程伯基和林克椿报道过脂和细胞色素 c 和细胞色素氧化酶之间的电子交换现象^[12,13].

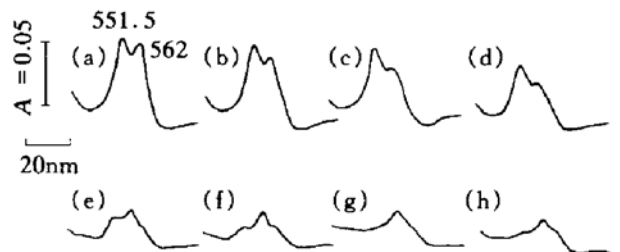


图 3 脂对泛醌细胞色素 c 还原酶还原性质的影响

(a) ~ (h): 每毫克细胞色素 c 还原酶中所含的大豆磷脂量分别为 0、0.32、0.40、0.48、0.56、0.64、0.72 和 1.00 mg.

图 4 给出了细胞色素还原性随重组脂量的

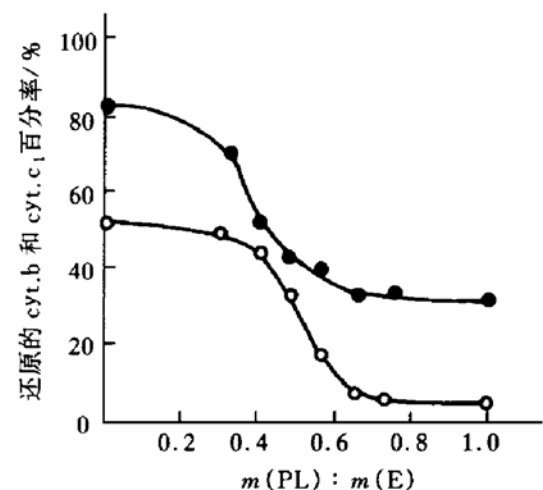


图 4 细胞色素氧化状态的变化与重组磷脂的相关性

●—●: cyt. b; ○—○: cyt. c₁.

相关变化, 在重组脂为每毫克蛋白含 0.3~0.6 mg 磷脂时, 细胞色素迅速还原, 此重组浓度正是活力恢复最大的浓度. 当浓度达每毫克蛋白含 0.8 mg 磷脂时细胞色素的氧化不再增加, 重组活力也达到最大. 浓度继续增加活力反而下降. 从图 4 看出每毫克蛋白中所含磷脂量高于 0.8 mg 时, 仍有 6.5% 的细胞色素 c_1 和 33.7% 的细胞色素 b 未恢复到氧化态, 这些不可逆恢复的部分有可能是蛋白变性的表现.

结果表明, 磷脂在维持泛醌细胞色素 c 还原酶活力和构象方面有着重要作用. 虽然经亲和层析法制备的酶丢失了大部分脂和醌, 失去了酶活力, 但是这些失去的酶活力可以通过脂和醌的重组得到恢复. 虽然脂的丢失使蛋白构象发生改变, 但是大部分构象可通过脂重组得到恢复.

参 考 文 献

- 1 Hatefi Y. *Ann Rev Biochem*, 1985; **54**: 1015
- 2 Mitchell P. *J Theor Biol*, 1976; **62**: 327
- 3 Gu L Q, Liu C H, Xu J X *et al.* *Tetrahedron*, 1990; **46** (9): 3199
- 4 King T E. In: Trumpower B L ed. *Function of quinone in energy conserving system*. New York: Academic Press, 1982: 3
- 5 Yu C A, Yu L. *J Bioener and Biomem*, 1993; **23** (3): 259
- 6 Kevin L, Paul W, Hans W *et al.* *J Mil Biol*, 1981; **149**: 259
- 7 Yue W H, Zou Y P, Yu C A. *Biochemistry*, 1991; **30**:

2303

- 8 Yu C A, Yu L. *J Biol Chem*, 1982; **257**: 2016
- 9 King T E. *J Biol Chem*, 1961; **236**: 2342
- 10 李 路, 郑连兴, 徐建兴等. *生物化学杂志*, 1992; **8** (2): 207
- 11 Yu C A, Yu L, Tsou E K. *J Biol Chem*, 1974; **249**: 4905
- 12 程昆蓉, 程伯基, 林克椿. *科学通报*, 1992; **37** (3): 263
- 13 程昆蓉, 程伯基, 林克椿. *生物化学杂志*, 1992; **8** (3): 307

Effect of Lipid on the Property of QH₂-Cytochrome c Reductase. Zhang Yixin, Shang Heyong, Xu Jianxing (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract A lipid-depleted QH₂-cytochrome c reductase has been prepared by a column of calcium phosphate. The activity of this enzyme is lower and the cytochromes contained in this enzyme is partially (about 53% of cytochrome b and 83% of cytochrome c_1) reduced. The reconstitution of the lipid-depleted QH₂-cytochrome c reductase with lipids can not only recover the activity but also induce the reduced cytochromes retain to its oxidized state. This result indicates that a special interaction between the lipid and protein is important for keeping the enzyme in its native conformation.

Key words QH₂-cytochrome c reductase, lipid reconstitution, protein conformation

间羟苯甲酸 4-羟化酶纯化及部分性质研究

陈 瑞

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

細川桂一

(日本川崎医科大学生物化学教研室, 仓敷市 701-01)

摘要 经超声破碎、硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤、磷酸钙胶层析和离子交换层析等步骤, 从 *Comamonas testosteroni* 菌株中获得了 SDS-PAGE 单一条带, 相对分子质量为 62×10^3 的间羟苯甲酸 4-