

研究报告

竹红菌乙素作猝灭剂研究 F_0 构象方法的建立*

李生广 封朝阳 乐加昌 徐 霆 林治焕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 线粒体 F_1F_0 复合体 F_0 部分 α 亚基的色氨酸荧光可被竹红菌乙素 (hypocrellin B, HB) 猝灭. 不同温度下测定 Stern-Volmer 图的结果显示, 猝灭常数 (K_{sv}) 随温度的增加而加大, 时间衰变荧光的结果显示, 荧光寿命随 HB 浓度的增加而减小, 加入不同浓度的 HB, F_1F_0 复合体的吸收峰没有位移. 这些实验结果支持动态猝灭机理. HB 还具有有效猝灭浓度低, 不影响酶的活力; 在脂相和水相的分布比率可高达 16 560:1; 实验操作简便等优点. 因此 HB 可作为理想的疏水相荧光猝灭剂, 研究与膜结合的 F_1F_0 复合体中镶嵌于膜脂内 F_0 的构象变化.

关键词 竹红菌乙素, F_1F_0 复合体, F_0 , 荧光猝灭, 构象

学科分类号 Q731

猪心线粒体 F_1F_0 复合体由嵌入膜内的质子转运蛋白 F_0 和与膜连接的可溶性蛋白 F_1 组成. 虽然已经清楚跨膜质子梯度是 ATP 合成的能量源泉, 但能量转运的机理仍然不清楚^[1]. 动力学的研究显示 F_0 和 F_1 间的构象相互作用和能量转运相联系, 但没有提供直接的构象证据^[2]. 其原因之一是没有简便有效的方法去测定与膜结合的 F_1F_0 复合体中嵌于膜脂内 F_0 部分的构象变化. 蛋白质的内源荧光和标记于蛋白质上染料发射的荧光对其周围不同环境参数 (例如温度, 微粘度, 离子强度和 pH) 极端敏感, 而环绕荧光发射基团邻近的蛋白质动力学行为的改变影响着这些环境参数. 另外, 利用外加荧光猝灭剂进行荧光猝灭技术的测定, 比直接荧光测定法更为灵敏和更具选择性. 因此, 荧光猝灭技术对获得蛋白动力学的信息, 推导其构象是强有力的工具^[3]. 气体氧作为荧光猝灭剂在实验中操作困难, 而聚丙烯胺是极性分子, 不能进入膜脂双层. 所以, 寻找一种适宜用于研究与膜结合的 F_1F_0 复合体的疏水部分 F_0 的荧光猝灭剂是极为需要的. 竹红菌乙素 (hypocrellin B, HB) 是竹

红菌素系列中的一种. 竹红菌素常被用作光敏试剂. 虽有报道 HB 作为荧光猝灭剂用于红细胞膜蛋白的研究^[4], 但其猝灭机理的分析仍存在静态猝灭. 我们选用 HB 作为荧光猝灭剂用于 F_1F_0 复合体的研究. 结果显示, HB 对镶嵌膜脂双层中 F_0 部分的 α 亚基色氨酸的猝灭为动态猝灭. 提出 HB 可被用作荧光猝灭剂去研究镶嵌膜脂双层中 F_0 的构象.

1 材料与方法

1.1 材料

ATP, 丙酮酸激酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸烯醇式丙酮酸为 Sigma 产品; NADH 为 Serva 产品; 5 μ l 玻璃纤维 (5 μ l glass wool), TC = 0.5%, 为 Fisher Scientific 公司产品; HB 由竹红菌甲素按文献 [5] 方法转化而制得.

1.2 方法

F_1F_0 复合体基本参照 Stiggall 的方法^[6]从

* 国家自然科学基金 (39670183), 北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室基金和生物物理研究所基金资助项目.

收稿日期: 1996-12-17, 修回日期: 1997-04-03

猪心线粒体制备. 酶溶在 STE (0.2 mol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris-H₂SO₄, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶液中. F₁F₀ 复合体的活力的测定, 采用偶联 PK 和 LDH 反应, 在日立-557 分光光度计上 340 nm 处测定 NADH 的被氧化量来完成的^[7,8]. F₁F₀ 复合体的膜脂双层囊泡的体积按 Highsmith 等方法^[9]测定. 蛋白质浓度用 Lowry 法^[10]测定. F₁F₀ 复合体的色氨酸荧光在日立 F4010 荧光分光光度计上, 2 ml STE 反应体系中含 150 μg F₁F₀ 条件下测定. 色氨酸荧光寿命的测定在 Edinburgh 时间分辨荧光分光光度计上, 2 ml STE 反应体系含 0.6 mg F₁F₀ 条件下进行. 三荧光寿命参数利用 Edinburgh 计算机软件程序直接处理测定的数据而得到. 荧光测定时激发波长为 290 nm, 发射波长为 340 nm. HB 的吸收峰在日立 UV-3200 分光光度计上测定, 所用体系同稳态荧光猝灭测定. HB 在脂相和水相的分布量, 分别按照孙继山等的方法^[11]测定.

2 结果和讨论

2.1 F₁F₀ 的色氨酸荧光可被 HB 所猝灭

F₁F₀ 复合体的色氨酸残基, 除其中的一个位于可溶性 F₁ 的 ε 亚基外^[12], 其余 7 个色氨酸残基均位于疏水部分 F₀ 的 α 亚基上. 因此 F₁F₀ 内源色氨酸残基的变化, 主要反映了与 α 亚基相关的 F₀ 部分的构象变化. 图 1 给出 F₁F₀ 色氨酸荧光被 HB 猝灭的实验结果. 从图 1a 可以看出, F₁F₀ 的色氨酸荧光强度随着 HB 浓度的增加而降低. 依据这些实验数据能够绘制成 Stern-Volmer 图 (图 1b). 在同样实验条件下 F₁F₀ 色氨酸的发射峰和 HB 的吸收峰分别在 340 nm 和 456 nm, 表明色氨酸发射峰区域内没有出现 HB 的吸收峰. 这结果揭示在色氨酸发射峰和 HB 的吸收峰之间不存在共振能量转移. 因此图 1 结果表明发生的猝灭为非能量共振猝灭.

2.2 HB 对 F₁F₀ 色氨酸荧光的动态猝灭

非能量共振荧光猝灭可分为两类. 一类为静态猝灭, 另一类为动态猝灭. 为了证明 HB

对 F₁F₀ 色氨酸荧光的猝灭为动态猝灭, 我们进行了以下三个实验.

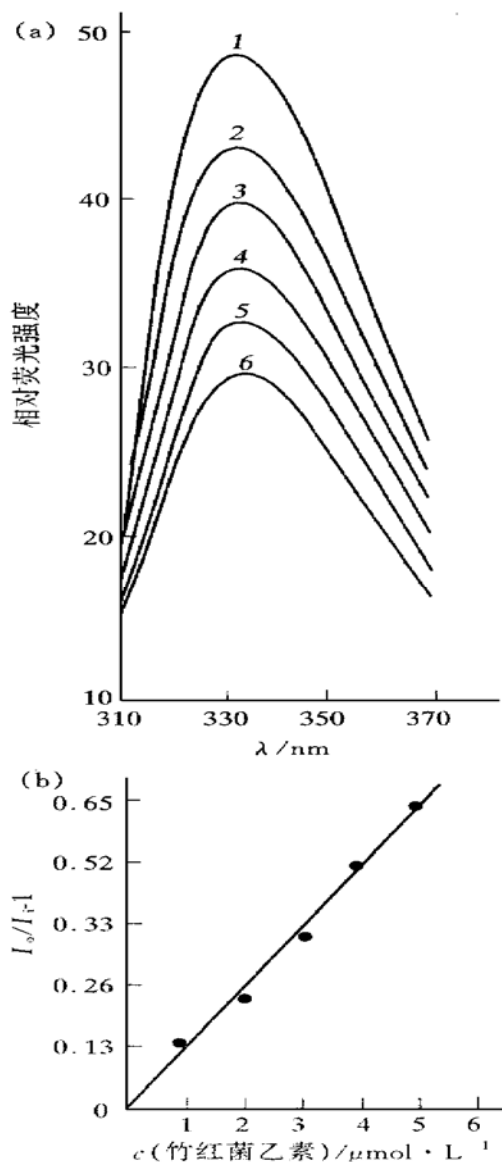


图 1 HB 引起的 F₁F₀ 复合体色氨酸荧光猝灭图 (a) 和 HB 引起的荧光猝灭 Stern-Volmer 图 (b)

$t = 30^{\circ}\text{C}$, (a) 1: 对照; 2: 1 μmol/L HB; 3: 2 μmol/L HB; 4: 3 μmol/L HB; 5: 4 μmol/L HB; 6: 5 μmol/L HB.

2.2.1 不同温度对 HB 猝灭常数的影响: 图 2 是不同温度下 HB 对 F₁F₀ 色氨酸荧光的 Stern-Volmer 猝灭图. 图 2 显示随着温度的增加,

K_{sv} 也增加。这是典型的动态猝灭特征，此结果表明 HB 引起的 F_1F_0 色氨酸荧光猝灭是动态猝灭。

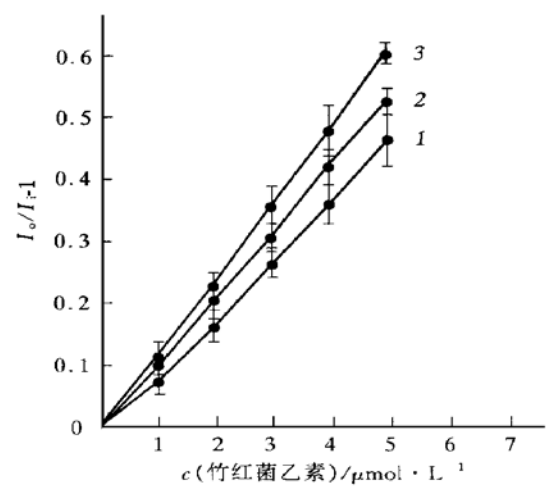


图 2 不同温度下 HB 引起 F_1F_0 复合体色氨酸荧光猝灭的 Stern-Volmer 图
1: 10℃; 2: 20℃; 3: 30℃.

2.2.2 HB 对 F_1F_0 荧光寿命的猝灭: 荧光寿命是鉴定动态或静态猝灭的最有效方法。静态猝灭发生时，猝灭剂不改变荧光分子激发态的寿命，故 $\tau_0/\tau_i = 1$ 。而动态猝灭时，猝灭剂的存在使荧光寿命缩短，其方程为： $\tau_0/\tau_i = I_0/I_i = 1 + K_{sv}[Q]$ ^[13] τ_0 和 τ_i 分别为猝灭剂不存在和存在时的荧光寿命。HB 对 F_1F_0 色氨酸荧光寿命的猝灭结果列于表 1 中。

表 1 HB 引起 F_1F_0 复合体荧光寿命的减短			
c (竹红菌乙素) / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	τ_1/ns	τ_2/ns	τ_3/ns
0 (对照)	6.639	3.188	0.763
2	6.253	2.895	0.729
6	6.119	2.543	0.602
8	5.591	2.172	0.561

注: $t = 25^\circ\text{C}$, τ 为荧光寿命。

表 1 显示对照组镶嵌于膜内 F_0 部分的 a 亚基有三类色氨酸残基，分别有三种不同的荧

光寿命，可分别用 τ_1 、 τ_2 和 τ_3 表示。三种类型的色氨酸荧光寿命均随 HB 浓度的增加而减短，表明 HB 引起的猝灭是动态猝灭。

2.2.3 不同浓度 HB 对 F_1F_0 吸收光谱的影响: 图 3 是在有无 HB 存在时 F_1F_0 复合体的吸收峰。加入不同浓度 HB 后， F_1F_0 复合体在 250~ 450 nm 波长范围内的吸收只有轻微的增加。数据经校正后吸收的增加低于 0.1%，且加入不同浓度的 HB 其吸收光谱也没有明显位移，表明 F_1F_0 在基态没有和 HB 形成复合物，即不存在静态猝灭。而动态猝灭只影响荧光分子的激发态，并不改变荧光物质的吸收光谱。所以这一事实也支持上述的动态猝灭机理。

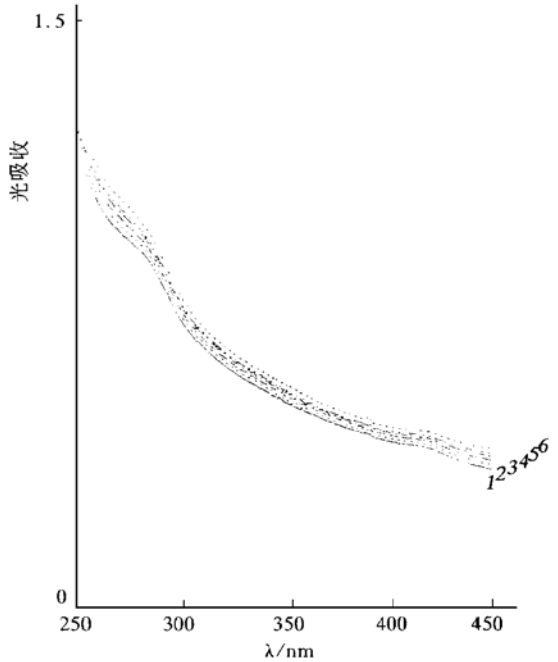


图 3 有无 HB 存在情况下 F_1F_0 复合体的吸收光谱
 $t = 28^\circ\text{C}$, 1: 对照; 2: 1 $\mu\text{mol/L}$ HB; 3: 2 $\mu\text{mol/L}$ HB;
4: 3 $\mu\text{mol/L}$ HB; 5: 4 $\mu\text{mol/L}$ HB; 6: 6 $\mu\text{mol/L}$ HB.

2.3 低浓度 HB 对 F_1F_0 复合体活力的影响
低浓度 (1~ 10 $\mu\text{mol/L}$) HB 对 F_1F_0 水解活力的影响结果见表 2。结果表明 HB 在实验条件下不影响 F_1F_0 的水解活力。

2.4 HB 在脂相和水相的分布
HB 是一种高疏水性化合物。在低于饱和点的浓度下，室温 1 min 内 HB 即能进入生物

膜并达到膜内外平衡. 我们分别测定了这时 HB 在水相和脂相的分布情况. 得到: $HB_{\text{水相}}: HB_{\text{脂相}} = 1: 9.2$ ($\mu\text{mol}: \mu\text{mol}$). 而实验体系的水相和脂相的体积比为: $V_{\text{水相}}: V_{\text{脂相}} = 1\ 800: 1$ ($\text{ml}: \text{ml}$). 因此, HB 在水相和脂相的实际浓度分布比率经计算应为: $1: 16\ 560$. 按照这样的结果, 则 HB 只猝灭镶嵌于膜脂双层中 F_0 部分 a 亚基的色氨酸荧光.

表 2 HB 对 F_1F_0 活力的影响

c (竹红菌乙素) / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	比活力 / $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$
0 (对照)	3. 13
1	3. 15
3	3. 12
5	3. 13
10	3. 14

综上所述, 镶嵌于膜中 F_0 部分 a 亚基的色氨酸荧光可被 HB 所猝灭, 猝灭机理为动态猝灭. 此外, HB 具有作为疏水相荧光猝灭剂的必备特征, 即有效猝灭浓度低 ($1\sim 10\ \mu\text{mol/L}$), 能迅速进入生物膜, 脂相和水相的分布比率可达 $16\ 560: 1$, 在实验条件下不影响 F_1F_0 复合体的水解活性, 易于操作等. 因此, HB 可以作为一种理想的荧光猝灭剂去研究与膜结合的 F_1F_0 复合体的疏水部分 F_0 的构象变化.

参 考 文 献

1 Issartel J P, Dupuis A, Garin J *et al.* The ATP synthase (F_0F_1) complex in oxidative phosphorylation. *Experientia*, 1992, **48** (4): 351~ 362
2 Penefsky H S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: Relationship to ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (6): 1589~ 1593
3 Somogyi B, Lakos Z. Protein dynamics and fluorescence quenching. *J Photochem Photobiol B: Bio*, 1993, **18** (1): 3~ 16
4 乐加昌, 秦静芬, 孙继山等. 竹红菌乙素对人红细胞膜蛋白荧光猝灭机理的研究. *感光科学与光化学*, 1993, **11** (3): 228~ 235
5 赵开弘, 蒋丽金. 竹红菌甲素在碱性和中性溶液中的结构变化. *有机化学*, 1989, **9**: 252~ 254

6 Stiggall D L, Galante Y M, Hatifi Y. Preparation and properties of an ATP-Pi exchange complex (Complex V) from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, 1978, **253** (3): 956~ 964
7 Pullman M, Penefsky H S, Datta A *et al.* Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated. *J Biol Chem*, 1960, **235** (11): 3322~ 3349
8 李生广, 孙 珊. 利用分光光度法测定 ATP 酶的水解活力. *生物化学与生物物理进展*, 1983, (6): 70~ 71
9 Highsmith S, Cohen J A. Special Organization of Car ATPase Molecules in Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *Biochemistry*, 1987, **26** (1): 154~ 161
10 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~ 275
11 孙继山, 张 莉, 乐加昌. 小鼠腹水型肝癌细胞对竹红菌乙素的摄取和滞留. *生物化学与生物物理进展*, 1993, **20** (4): 289~ 293
12 Walker J E, Fearnley I M, Gay N J *et al.* Primary Structure and Subunit Stoichiometry of F_1F_0 -ATPase from Bovine Mitochondria. *J Mol Biol*, 1985, **184** (4): 677~ 701
13 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法. 第二版. 北京: 科学出版社, 1990. 115~ 119

A Method of Studying Conformation of Membrane-Bound F_0 Using Tryptophan Fluorescence Quenching by Hypocrellin B. LI Sheng-guang, FENG Zhao-yang, YUE Jia-chang, XU Ting, LIN Zhi-huan (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The tryptophan fluorescence of a subunit of F_0 moiety of mitochondrial F_1F_0 can be quenched by the addition of Hypocrellin B. The determination of the Stern-Volmer plot at different temperatures is carried out. The result shows that the K_{sv} increased with the increase of temperature. The experimental result of the time-resolved fluorescence decay shows the decrease of lifetime of tryptophan fluorescence of F_0 with the increase of concentration of HB. No shift in the absorbance spectra of F_1F_0 were occurrent at varying concentration of HB. The results support the dynamic quenching. In addition, HB possess the necessary characters to be used as a quencher in the hydrophobic phase as follows: the low concentration of effective quenching; no

effect on the activity of F_1F_o ; the ratio of the partition coefficients between lipid-phase and water-phase as high as 16 560: 1. So HB can be used as a ideal fluorescence quencher for the

study of conformational change of F_o moiety of membrane-bound F_1F_o complex.

Key words hypocrellin B, F_1F_o complex, F_o , fluorescence quenching, conformation

紫外辐射诱发 NIH3T3 细胞凋亡时 DNA 断裂的特性*

胡庆柳 丁振华 谭小华¹⁾ 王 红

(第一军医大学放射医学教研室, 广州 510515)

摘要 用常规琼脂糖凝胶电泳 UVB 照射后培养不同时间的 NIH3T3 细胞 DNA, 两个样本均未出现凋亡梯形带, 而用相同条件处理的昆明小鼠胸腺细胞 DNA 出现了典型的梯形带. 再用反转电场琼脂糖凝胶电泳 (FIGE) UVB 照射后培养不同时间的 NIH3T3 细胞 DNA, 发现 DNA 先断裂成低于 23 kb 的大分子片段, 然后进一步断裂成小分子片段, 但始终未出现梯形带, 说明 DNA 并不总是从核小体之间断裂的.

关键词 细胞凋亡, DNA 梯形带, 紫外辐射

学科分类号 Q523

凋亡 (apoptosis) 是与坏死 (necrosis) 不同的另一种细胞死亡方式. 在形态上表现为: 早期细胞膜、核膜、细胞器完整, 细胞质、细胞核固缩; 晚期部分胞膜包裹部分细胞质和细胞核形成凋亡小体. 在生化上通常表现为 DNA 在核小体之间断裂, 琼脂糖凝胶电泳时出现梯形带 (DNA ladder). 我们在研究紫外线所致 NIH3T3 细胞的凋亡时却发现其 DNA 电泳未出现凋亡梯形带.

1 材料和方法

1.1 材料

昆明小鼠购自本校动物所. NIH3T3 细胞由南方医院血液科馈赠. RPMI1640 由美国 GIBCO 公司生产. 新生小牛血清由广州畜牧场生产. 胰蛋白酶由德国 Serva 公司生产. 紫外线灯管 (单色光) 为上海顾村电光仪器厂产品 (功率为 15 W, UVB 波长为 320 nm). 普

通凝胶电泳仪为北京六一仪器厂产品. 反转电场凝胶电泳仪由美国 Hoefer 公司生产. CO_2 孵育箱为美国 Harris 公司生产. 琼脂糖为杭州微生物试剂厂生产.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 取昆明小鼠胸腺, 在 Hank's 液中漂洗干净, 去除其他组织, 放入消毒后的培养皿中, 用眼科剪反复剪成碎块, 加入少量完全培养基 (RPMI1640, 15% 小牛血清), 用吸管反复吹打后, 均匀点于六孔培养板. 吸掉多余的培养基, 以保证组织块不被悬浮起来. 放入 $37^\circ C$ 、5% CO_2 的孵箱中培养 12 h 后, 大部分组织块已紧密贴壁, 周围长出少量细胞. 加入适当的完全培养基继续培养, 直至细胞长满. NIH3T3 细胞的培养按常

* 国家自然科学基金资助项目 (39670192).

¹⁾ 南方医院消化科, 广州 510515.

收稿日期: 1996-11-20, 修回日期: 1997-02-28