

The result from ^3H -TdR incorporation demonstrated that the synthesis of DNA reduced when the concentration of R-PE increased from 0.01 to 0.32 mg/L. Besides, pUC18 DNA showed a conversion from supercoiled into linear conformation. The conclusion comes that R-PE mediated PDT can

influence the conformation of DNA, and it may be one of the mechanisms of R-PE mediated photodynamic therapy.

Key words phycoerythrin, photodynamic therapy, DNA synthesis

大豆液泡膜 H^+ -ATPase 功能与构象关系的初步研究*

董彩华 王志强 王延枝¹⁾

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 大豆液泡膜 V 型 H^+ -ATPase 是 ATPases 中的一种, 它在植物细胞的生长发育中有重要的作用. 利用竹红菌乙素 (HB) 和 KI 这两种分别猝灭蛋白质疏水区域内源荧光和亲水区域内源荧光的荧光猝灭剂, 在不同 pH 值、温度条件下对纯化的大豆液泡膜 V 型 ATPase 进行荧光猝灭实验, 初步探讨了 V 型 H^+ -ATPase 的水解活性同其蛋白质折叠状态间的关系. 研究表明, 通过比较不同 pH 值、温度条件下蛋白质疏水区域和亲水区域内源荧光的荧光猝灭常数 (K_{SV}), 发现当环境 pH 值、温度偏离酶的最适 pH 值和温度时, 蛋白质的内源荧光强度降低且疏水区域和亲水区域内源荧光的荧光猝灭常数 (K_{SV}) 降低, 说明伴随着酶的水解活性降低, 蛋白质的折叠状态发生了变化. 我们认为蛋白质在膜内的折叠状态变化是酶失活机制的一个重要方面, 为植物的抗冻和抗盐研究提供了一定的参考.

关键词 V 型 H^+ -ATPase, 竹红菌乙素, 荧光猝灭

学科分类号 Q731

V 型 H^+ -ATPase 的生物功能是消耗 ATP, 跨膜向液泡内转运质子从而产生质子跨膜梯度, 为各种离子和代谢物的跨膜运输提供动力. 它的生物功能是最基本的生命活动之一. 但 V 型 H^+ -ATPase 的生物功能很大程度上受到 pH 值、温度的影响, 因此它同植物的抗盐性和抗冻性有密切的关系^[1]. 荧光猝灭技术是一种利用蛋白质的自身发光基团, 通过在水溶液中加入荧光猝灭剂而获得许多关于膜蛋白质构象的光生物学技术^[2]. 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环境参数 (例如温度和 pH) 极端敏感, 而这些环境参数的改变影响着环绕荧光发射基团附近的蛋白质动力学行为. 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有选择性. 因此, 荧光猝灭技术对获得蛋白质动力学的信息, 推导其构象是强有力的工具^[3]. V 型 H^+ -ATPase 是一种大分子复合物, 具有较强的内源荧光, 并且是由处于膜外亲水区 V_1 部分和疏水区 V_0 部分共同组成的^[4], V 型 H^+ -ATPase 的 V_1 、 V_0 部分可以分别被不同性质的荧光猝灭剂猝灭.

竹红菌乙素 (HB) 主要猝灭膜内蛋白质内源荧光而 KI 主要猝灭膜外蛋白质内源荧光. 这两种荧光猝灭剂的猝灭都是动态过程并满足 Stern-Volmer 方程^[2]. 我们通过测定不同 pH 值、温度条件下 HB、KI 的荧光猝灭常数 (K_{SV}), 对 V 型 H^+ -ATPase 的膜内外构象在不同条件下发生的变化进行了分析, 进一步探讨了 V 型 H^+ -ATPase 的生物活性同它在生物膜内的折叠状态间的关系. 完善了 V 型 H^+ -ATPase 因 pH、温度引起的失活机制.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料: 大豆 (由中国农业科学院粮食作物研究所提供) 置于生化培养箱 25 °C 闭光萌发, 3~5 d 后取芽, 称重后用预冷的无离子水漂洗.

* 国家自然科学基金资助项目 (39570434), 中国科学院生物物理研究所大分子国家重点实验室外部课题.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 87684232, E-mail: yzwang@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-11-07, 修回日期: 2000-04-10

1.1.2 试剂: Hepes、Tris、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 Boehringer 公司产品, 二硫苏糖醇 (DTT) 为 Gibco 公司产品, EGTA 为 Ambers 德国进口分装产品, 其余试剂均为国产分析纯试剂. 竹红菌乙素 (HB) 由中国科学院生物物理研究所副研究员乐加昌提供.

1.2 大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 的分离纯化

参看文献 [4] 进行.

1.3 ATPase 水解活力测定

采用 Hodges 的定磷法^[5], 在 37℃ 反应 20 min, 测定反应体系无机磷的释放量. 反应液中含 30 mmol/L Hepes-Tris (pH 7.2), 50 mmol/L KCl, 3 mmol/L ATP·Na⁺, 0.5 mmol/L MgSO₄, 0.6 mmol/L NaN₃, 0.4 mmol/L NaVO₃, 以未加入待测蛋白酶组和加入组无机磷释放量之差表示酶活.

1.4 蛋白质含量测定

利用修改 Lowry 法^[6]. 样品先用三氯乙酸 (TCA) 沉淀, 再用碱液悬浮, 以除去影响 Lowry 法测定的各种成分^[7]. 以牛血清白蛋白为标准品.

1.5 蛋白质内源荧光的测定

大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 制备成 0.1 g/L 蛋白质浓度 (25 mmol/L Hepes-Tris, 20% 甘油, 4 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, pH 7.2) 采用日立 850 型荧光光谱仪, 以 285 nm 的激发波长, 在 60 s 内扫描 300~400 nm 波长范围内蛋白质内源荧光的强度值.

1.6 内源荧光猝灭

在 0.1 g/L 蛋白质浓度的大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 制剂中每隔 90 s 分 5 次滴加一定量的 HB 或 KI, 使 HB 浓度分别依次达到 1、2、4、8、10 μmol/L, 而 KI 浓度分别依次达到 1、5、10、50、100 mmol/L, 并在 90 s 时在日立 850 型荧光光谱仪上读取 285 nm 激发波长, 335 nm 发射波长下蛋白质内源荧光的强度值.

2 结果与分析

2.1 Stern-Volmer 方程

Stern-Volmer 方程^[5]为: $F_0/\Delta F = 1/E + 1/(E + K_{SV}[Q])$; $\Delta F = F_0 - F$. 其中, F_0 : 没有猝灭剂时蛋白质内源荧光值; F : 猝灭剂作用后的蛋白质内源荧光值; $[Q]$ 为猝灭剂的摩尔浓度; K_{SV} 为 Stern-Volmer 方程猝灭常数. 用 $F_0/F - 1$

对 $[Q]$ 做图, 斜率为 K_{SV} . K_{SV} 能反映出可被猝灭剂接触到的发荧光的氨基酸的多少, 也即可相应反映出蛋白质的折叠程度. K_{SV} 值越小说明蛋白质的折叠程度越大. 即蛋白质趋向聚集状态^[8].

2.2 大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 内源荧光的测定

按照 1.5 的方法测定大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 的内源荧光, 得到结果见图 1. 从图 1a 的结果可以看出, 在 285 nm 的激发波长下, 大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 的荧光发射强度波长峰值为 335 nm, 以后的实验均采用这一发射波长. 而图 1b 的结果显示, 当环境中的 pH 值偏离了最适 pH 值时, 蛋白质的荧光强度降低, 而发射波长峰值不变. 这说明当环境中的 pH 值偏离了最适 pH 值时, 存在着 V 型 H⁺-ATPase 进一步折叠弯曲, 构象趋于紧密的可能性, 但仍需进一步实验加以证实. 当温度改变时, 也可以得到相似结论 (结果未显示).

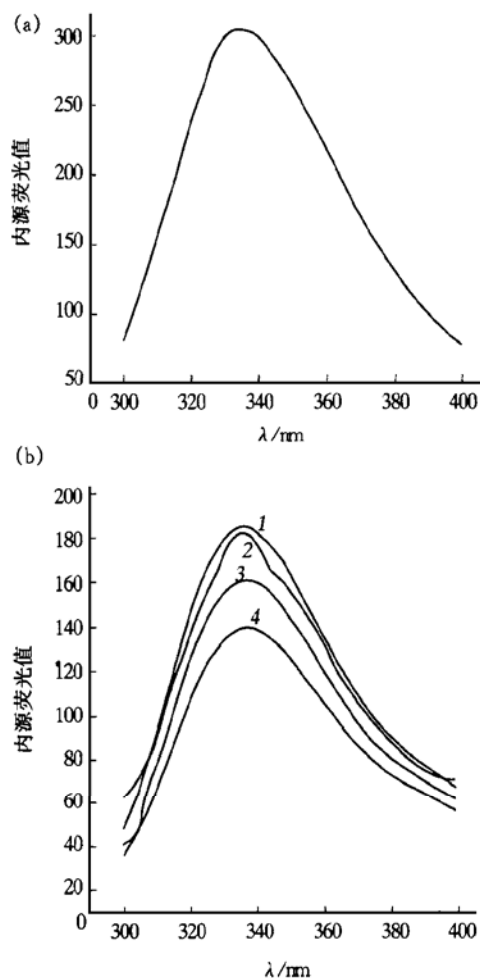


图 1 大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 内源荧光
(a) 蛋白质的激发波长时间扫描图; (b) 改变蛋白质溶液 pH 值后测定的激发波长时间扫描图. 1: pH 7.0; 2: pH 7.5; 3: pH 6.5; 4: pH 8.0.

2.3 不同 pH 值下大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 内源荧光猝灭

按照 1.6 中的方法, 将同一批提取的酶制剂用 HEPES-Tris 缓冲液调到 pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 再分别用 HB 和 KI 猝灭. 结果如图 2 所示. 发现当 pH 值偏离最适 pH 值 7.0 时, HB 和 KI 猝灭的 K_{SV} 值均有所下降, pH 值偏离越多, K_{SV} 值下降越快. 这说明蛋白质疏水区和亲水区都进一步折叠弯曲, 构象趋于紧密. 同酸性环境相比, 碱性环境下两种猝灭的 K_{SV} 值下降更多. 与此相对的是碱性环境对 V 型 H⁺-ATPase 的水解活性的影响比酸性环境大^[9]. 也就是说 V 型 H⁺-ATPase 在一定范围内耐酸不耐碱, 这可能是因为 V 型 H⁺-ATPase 长期处于中西部地区适应中性偏酸的环境所引起的.

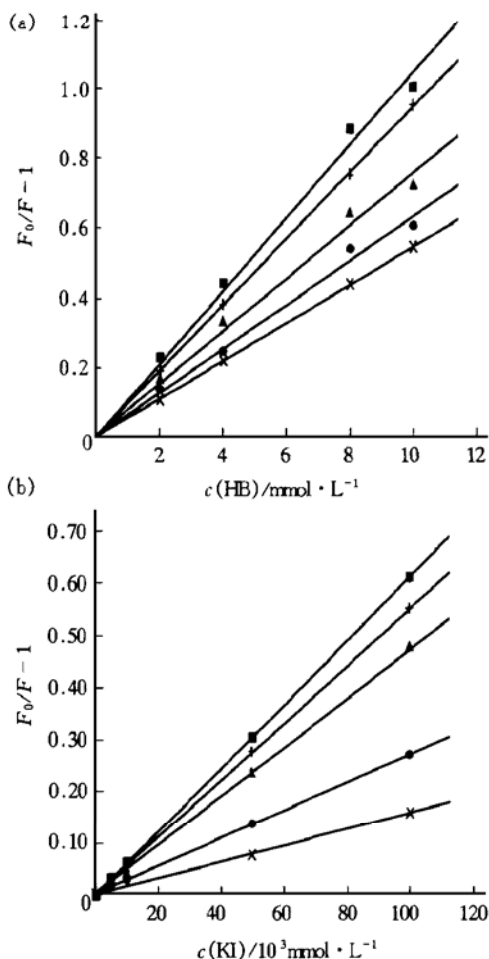


图 2 不同 pH 值下大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 的 HB 和 KI 猝灭

(a) HB 猝灭; (b) KI 猝灭. ●—●: pH 6.0; + —+ : pH 6.5; ■—■: pH 7.0; ▲—▲: pH 7.5; × —×: pH 8.0.

2.4 不同温度下大豆液泡膜 V 型 H⁺-ATPase 内源荧光猝灭

由于 V 型 H⁺-ATPase 的水解活性对于温度十分敏感, -70℃下才可长期存放, 常温下易失活, 因此在本实验中我们把 4℃作为正常温度, 比较 25℃和 37℃下处理 5、10、20、40 min 后 HB 和 KI 猝灭的变化. 结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出温度上升, HB 和 KI 猝灭的 K_{SV} 值均有所下降, 温度上升越多, 在高温条件下处理时间越长, K_{SV} 值下降越快. 处理一段时间后 K_{SV} 值不再下降, 即酶的构象已经稳定了. 25℃条件下, 20 min 后构象基本稳定, 其后 K_{SV} 值变化不大; 而 37℃条件下, 10 min 后构象基本稳定, 其后 K_{SV} 值变化不大. 这说明温度使酶在疏水区和亲水区的构象更趋于紧密, 并且这种变化是一个需要时间的动态过程, 温度越高, 变化越快. 这一结果同酶蛋白的水解活性分析相一致^[9].

3 讨论

HB 是从竹红菌 (*Parasitic fungus*) 中分离出的一种脂溶性荧光猝灭剂, 主要富集在膜区或蛋白质的疏水区^[2], 在生物膜内其荧光激发峰值在 490 nm 左右, 发射峰值在 630 nm 处. 它是继气态分子氧和丙烯酰胺后发现的又一种更为优良的膜蛋白中性荧光猝灭试剂. 可用于猝灭膜蛋白疏水区内源荧光^[10], 这一猝灭过程是一个动态过程, 满足 Stern-Volmer 方程^[2]. HB 对膜内蛋白内源荧光猝灭有以下特点: a. 进入细胞膜的速度快, 不扩散到水相^[11]. b. 在细胞膜体系中与生物大分子不形成共价结合, 不影响蛋白质的性质和功能^[8]. c. 与膜蛋白质的内源荧光不存在吸收光谱和发射光谱的重叠, 不会对内源荧光产生影响^[2]. 因此 HB 是一种近年来广泛使用的用于研究膜蛋白构象的中性内源荧光猝灭剂. 同 HB 相对的 KI 是一种用于猝灭膜蛋白亲水区内源荧光的猝灭剂, 也是一种动态过程, 满足 Stern-Volmer 方程^[2].

V 型 H⁺-ATPase 是一种膜蛋白, HB 猝灭的 K_{SV} 值变化比非膜蛋白 HB 猝灭的 K_{SV} 值变化更明显: 由于它有一个较大的暴露于膜外的 V₁ 区, 其 KI 猝灭的 K_{SV} 值大变化比一般的膜蛋白明显. 当环境的温度、pH 值变化时其 HB 和 KI 猝灭的 K_{SV} 值会有相对较为明显的变化. 在偏离此酶的最适 pH、温度条件的 HB 和 KI 猝灭中我们观察到以下

现象: a. 内源荧光吸收值下降; b. 猝灭常数 K_{SV} 下降. 由于猝灭剂 HB 和 KI 的猝灭是一个以扩散为主的动态过程^[2], 因此当体系中的蛋白质发生卷曲时猝灭常数 K_{SV} 下降, 也就是说其被猝灭的可能性下降^[11].

通过本实验我们发现, V 型 H^+ -ATPase 的进

一步卷曲和折叠是它失活的一个重要原因. 偏离此酶的最适 pH、温度时, 蛋白质的疏水区和亲水区都会卷曲, 构象趋于紧密, 从而导致酶失活. 偏离程度越大, 卷曲得更紧密, 酶也失活得更厉害. 碱性环境对酶的影响比酸性环境更大, 并且这种构象变化是一个需要时间的动态过程.

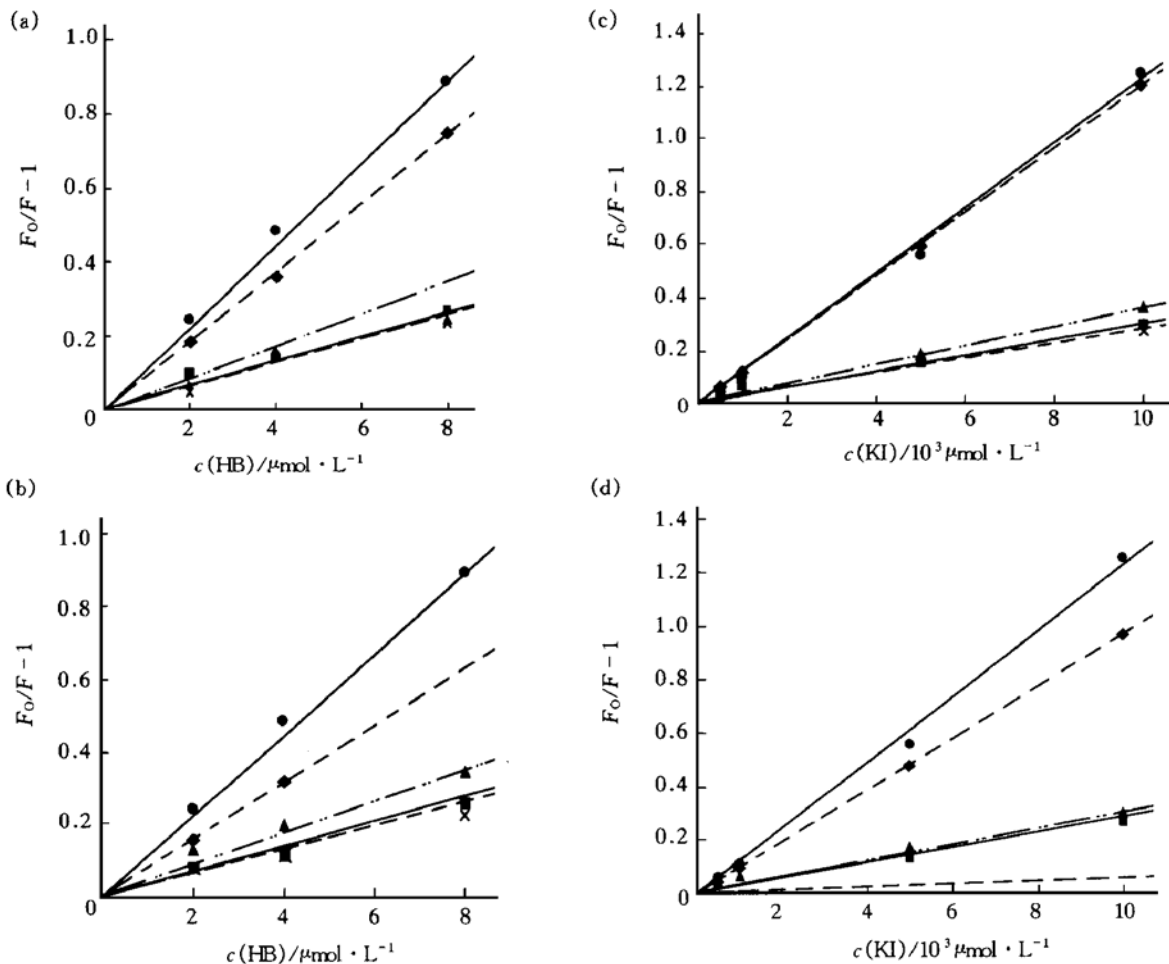


图3 不同温度下大豆液泡膜 V 型 H^+ -ATPase 的 HB 和 KI 猝灭

(a) 25°C 下 HB 引起的内源荧光猝灭图; (b) 37°C 下 HB 引起的内源荧光猝灭图; (c) 25°C 下 KI 引起的内源荧光猝灭图; (d) 37°C 下 KI 引起的内源荧光猝灭图. ●—●: 正常; ◆---◆: 5 min; ▲---▲: 10 min; ■---■: 20 min; ×---×: 40 min.

致谢 HB 由中国科学院生物物理研究所大分子国家重点实验室副研究员乐加昌提供.

参 考 文 献

- Nelson D E, She B, Bohnert H J. Salinity tolerance: mechanism, models and the metabolic engineering of complex traits. *Genetic Engineering*, 1997, **20** (1): 153~ 176
- 杜 健, 程龙生. 竹红菌毒素对红细胞膜内脂双层的微扰. *实验生物学报*, 1991, **24** (2): 153~ 160
Du J, Cheng N S. *Acta Biology Experimentals Sinica*, 1991, **24** (2): 153~ 160
- 李生广, 封朝阳, 乐加昌, 等. 竹红菌毒素作猝灭剂研究 F_0 构象方法的建立. *生物化学与生物物理进展*. 1999, **26** (1): 49~ 53
- Li S G, Feng Z Y, Yue J C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1998, **25** (1): 49~ 53
- Pederson P L, Amzel L M. ATP synthases: structure, reaction center, mechanism and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem*, 1993, **268** (25~ 26): 9937~ 9940
- Hodges T K, Leomand R T. Purification of plasma membrane-band ATPase from plant roots. *Methods in Enzyme*, 1974, **29** (2): 392~ 397
- Lowry O H. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **220** (1): 193~ 265
- Peterson G L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem*,

- 1977, **83** (2): 346~ 356
- 8 乐加昌, 王文玉, 江丕栋, 等. 用荧光漂白和恢复技术研究竹红菌乙素在小鼠肝癌细胞内的扩散过程. 生物物理学报, 1993, **9** (3): 669~ 672
Yue J C, Wang W Y, Jiang P D, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1993, **9** (3): 669~ 672
- 9 Wang Y Z, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and mitochondrial H⁺-ATPase of oat roots. J Bio Chem, 1985, **260** (25~ 26): 10434~ 10440
- 10 乐加昌, 秦素芬, 叶健平, 等. 竹红菌乙素对于人红细胞膜荧光猝灭机理研究. 感光科学与光化学: 1993, **11** (3): 228~ 235
Yue J C, Qin S F, Ye J P, *et al.* Photographic Science and Photochemistry, 1993, **11** (3): 228~ 235
- 11 乐加昌, 屠亚平, 庞素珍. 竹红菌乙素对肌质网 Ca²⁺-ATPase 蛋白质色氨酸荧光猝灭研究. 科学通报, 1995, **40** (1): 76~ 79
Yue J C, Tu Y P, Pang S Z. Chinese Science Bulletin, 1995, **40** (1): 76~ 79

Preliminary Study on Relationship Between Function and Conformation of Vacuolar H⁺-ATPase of Soybean. DONG Cai-Hua, WANG Zhi-Qiang, WANG Yan-Zhi (*School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Soybean vacuolar H⁺-ATPase is one of the

ATPases and play an important role in the growing period of the plant. Hypocrellin B and KI quench the intrinsic fluorescence of outside and inside membrane domain respectively. This two quench probes have been used to quench the protein's intrinsic fluorescence under different pH and temperature. The relationship between hydrolysis activity and folding condition of V-ATPase has been preliminarily studied. The K_{SV} of outside and inside membrane domain under different pH and temperature had been compared. It shows that the intrinsic fluorescence of the protein and K_{SV} of outside and inside membrane domain all dropped with the deviation of pH and temperature from the optimum condition and the activity of the enzyme dropped too. This illustrates that the folding condition had been changed with the dropping of the enzyme's activity. The changing of the folding condition of the protein plays an important role in the inactivation mechanism.

Key words V-type H⁺-ATPase, HB quenching, K_{SV} , fluorescence quenching

过氧化氢对培养心肌细胞损伤作用的研究

曹纯章 卜丽莎 高 申

杨同书

(白求恩医科大学第三临床学院中心研究室, 长春 130031)

(白求恩医科大学基础医学研究所, 长春 130031)

摘要 氧化应激时产生大量的自由基, 造成心肌细胞的损伤. 过氧化氢 (H₂O₂) 是有机体氧化代谢产物, 同时是一种活性氧. 应用不同浓度的 H₂O₂, 分别于不同作用时间, 动态观察其对心肌细胞的损伤作用. 从实验结果看到, 低浓度的 H₂O₂ (< 0.1 mmol/L) 作用 2 h, 使心肌细胞产生早期的生物化学的改变, 如 MDA 产生堆积和细胞周期时相改变 (G1 期细胞增加, G2 期细胞减少), 此时心肌酶基本无泄漏, 心肌细胞的死亡率很低, HE 形态学观察基本无改变; 随着 H₂O₂ 浓度的增加 (1~ 5 mmol/L) 和作用时间的延长, 进一步诱导细胞损伤加剧, LDH 释放和 MDA 积累明显升高, 细胞死亡率也明显增加, 已具有统计学意义. 同时可观察到其病理形态学的坏死性改变; 当 10 mmol/L H₂O₂ 作用时, 细胞大量死亡, 形态学可见细胞极度收缩、脱落, 形成大面积的细胞脱落区. 因此, H₂O₂ 作为一种活性氧自由基, 依其浓度和作用时间不同可造成不同程度的心肌细胞的损伤. 辣根过氧化物酶作为一种自由基清除剂, 可明显减少 H₂O₂ 活性氧自由基对心肌细胞的损伤作用.

关键词 活性氧自由基, 过氧化氢 (H₂O₂), 心肌细胞, 抗氧化剂

学科分类号 R363, R34