第624次学术讨论会·顺磁共振的科学研究与医学应用

线粒体呼吸链的电子顺磁共振

毛杰利¹, 张琪^{1,2}, 石发展^{1,2}, 苏吉虎^{1,2*}, 杜江峰^{1,2}

1. 中国科学技术大学近代物理系, 中国科学院微观磁共振重点实验室, 合肥 230026;

2. 中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230026

* 联系人, E-mail: sujihu@ustc.edu.cn

有氧呼吸(aerobic respiration)是地球上高等生物繁衍生息的生理基础,而使这个生理活动得以正常维持的基础是绿色植物的光合作用(photosynthesis)^[1,2].后者利用太阳光能将CO₂和H₂O合成前者所需的富含化学能的有机物,同时释放出氧气以维持大气层中约21%的含氧量^[1].随着人类社会的发展,人们生活水平日渐提高,人们也迫切希望了解人体自身的各种生命活动,以获得健康体质,达到延年益寿的目的.众所周知,人体各种生命活动所需的能量主要由有氧呼吸提供.因此,作为呼吸作用主体的线粒体,具有非常重要且不可替代的生理功能.比如,它一方面为其他生理活动提供能量,另一方面还维持这些生理活动的正常进行^[2].当线粒体发生功能性障碍或生理活动失调时,会诱发许多疾病,甚至危及生命^[3,4].

1 氧气交换和呼吸链

线粒体呼吸作用所需的氧气通过呼吸提供^[5].人体从大气摄取所需的O₂,并排出生理代谢所产生的CO₂,这个气体交换过程分成外呼吸(肺通气与肺换气)、气体在血液中的运输、内呼吸(组织细胞与毛细血管血液间的气体交换)等.人体通过呼吸器官肺与外界通气后,肺泡与肺毛细血管血液间进行气体交换,肺泡中的O₂扩散到毛细血管内,同时毛细血管中的CO₂扩散到肺泡并由肺呼出.这两种气体均从气体分压高处向气体分压低处自由扩散,血液中O₂和CO₂有物理溶解和化学结合两种方式(其中物理溶解所占比例很少),氧气含量常用氧分压 pO_2 (partial pressure of oxygen)来描述.O₂进入血液时,先以物理溶解的方式存在,当 pO_2 高时,则进入红细胞中与血红蛋白以化学结合的方式存在,运输至 pO_2 低的组织时,血液中物理溶解的氧先溢出并扩散至组织,此时血液中物理溶解氧的 pO_2 下降,红细胞中化学结合的氧分离出以增加物理溶解的氧,达到动态平衡.代谢产生的最终产物CO₂也是以同样的原理从组织扩散至血液,运输至肺部进入肺泡,通过气体交换而释放到大气中.

在氧气参与下,组织细胞通过各种酶的催化作用,把以葡萄糖为主的有机物彻底氧化分解,产生二氧化碳和水,并将所释放能量用于推动ATP的合成,后者为各种生命活

苏吉虎 中国科学技术大学近代物理系,中国科学院微观磁共振重点实验室教授.以电子顺磁共振波谱学为主要研究手段,从事物理、化学、生物等交叉学科的研究,主要有:(1)绿色植物光合作用中光系统II所催化的水氧化机理;(2)漆酶催化多酚有机物的降解机理,即苯环的开环方式,探讨其生物和化学应用前景;(3)磁性同位素和非磁性同位素的化学反应的异同;(4)由过渡离子构成的单分子磁体,如V15, Cu3等多核化合物,筛选出具有可用前景的磁性载体,用于量子信息和量子调控的应用研究;(5)金属酶的生物改造、有机金属配合物的性质、自由基化学和生物学等.

动提供所需的活泼能量.

一般地,有氧呼吸分成三个阶段^[6]:

第一阶段是糖酵解过程,不需要氧气,在细胞质基质中进行.该过程将葡萄糖分解为丙酮酸并产生能量,总反应式:葡萄糖+2ADP+2Pi+2NAD⁺→2丙酮酸+2NADH+2H⁺+2ATP+2H₂O.

第二阶段是柠檬酸循环(亦称三羧酸循环),在线粒体基质中进行.第一阶段产生的丙酮酸在丙酮酸脱氢酶催化下转化为乙酰辅酶A(acetoacetyl coenzyme A, CoA),继而进入柠檬酸循环.总反应式:乙酰-CoA+2H₂O+3NAD⁺+FAD+GDP+Pi→CoA-SH+3NADH+3H⁺+FADH₂+GTP+2CO₂.

第三阶段是氧化磷酸化,在线粒体内膜上进行.该过程需要氧的参与,将前两个阶段所积累的NADH和FADH₂氧化并形成水,所释放的能量储存在ATP中.NADH或FADH₂所携带的电子沿着线粒体内膜上的电子传递链一步步传递到最终电子受体氧气.该电子传递链主要由5个蛋白质复合体构成(图1)^[7-9],分别是复合体I(NADH-泛醌氧化还原酶, NADH-ubiquinone oxidoreductase),复合体II(琥珀酸-醌氧化还原酶, succinate-quinone oxidoreductase),复合体III(细胞色素bc₁, cytochrome bc₁),复合体IV(细胞色素c

图 1 (网络版彩色)哺乳动物线粒体内膜上的蛋白质复合体和电子传递链。与电子传递耦合形成的跨膜质子动力势,被复合体 V(F_1F_0 -ATP 合酶, F_1F_0 -ATP synthase)利用来催化 ADP 和磷酸 Pi 合成 ATP。其他必需组分有泛醌(ubiquinone, Q)、还原泛醌(ubiquinol, QH_2)等^[7]

Figure 1 (Color online) The protein complex and electron transport chain in the mitochondrial inner membrane of mammals. The formed proton motive force coupled with electron transport is utilized by complex V (F_1F_0 -ATP synthase) to catalyze the synthesis of ATP from ADP and phosphoric acid Pi. The other necessary components are ubiquinone (Q), ubiquinol (QH_2) and so on^[7]

氧化酶, cytochrome c oxidase)和复合体 V F_1F_0 -ATP 复合酶 (F_1F_0 -ATP synthase)。蛋白复合体 I~IV 按照电子亲和力递增的顺序排列成图 1 所示, 它们的活性中心是黄素、铁硫中心、血红素(或铁卟啉)、铜离子等电子传递体(图 2)。这个由多个电子传递体相互耦合而成的电子传递路径, 称为呼吸电子传递链(respiratory electron transport chain)^[8], 简称呼吸链。在植物细胞内还存在其他电子传递链, 称为光合电子传递链(photosynthetic electron transport chain)^[1]。

在复合体 I, III, IV 中, 电子传递促使 H^+ 从线粒体基质侧转移到线粒体膜间隙, 进而在线粒体内膜两侧形成跨膜质子动力势(proton motive force, PMF), 这种与跨膜质子动力势相耦合的电子传递, 称为质子耦合的电子传递(proton-coupled electron transfer, PCET)^[1,9]。当质子从膜间隙通过 F_1F_0 -ATP 复合酶回流至线粒体基质时, 推动 ADP 和 Pi 形成 ATP^[10]。氧气作为最终的电子受体, pO_2 将影响着呼吸链的电子传递效率和 ATP 的合成。实验上, 利用一些特殊的电子传递抑制剂, 能够选择性地阻断呼吸链中某

个活性部位的电子传递功能, 来研究电子传递次序、相应蛋白的结构与功能、各个蛋白复合体之间的相互作用(如反馈调节)等。常见的电子传递抑制剂有鱼藤酮、安密妥、杀粉蝶菌素 A、抗霉素 A、氰化物、叠氮化物、一氧化碳等; 影响 ATP 合成的有解偶联剂(2,4-二硝基苯酚、氯化铵、短杆菌肽)、氧化磷酸化抑制剂如寡霉素 A(oligomycin A)、离子载体抑制剂如缬氨霉素等^[6]。

2 电子传递与电子顺磁共振

综上所述, 线粒体的生理功能与呼吸链的电子传递效率及 pO_2 等有着非常密切的联系。如何研究呼吸链与 pO_2 的动态变化, 如何比较生理性与障碍性的电子传递动态差异, 是相关领域研究的热点和难点。如何原位、无损地研究呼吸链的动态电子传递, 是生命科学研究中的难题。在诸多物理与化学的研究方法中, 电子顺磁共振波谱(electron paramagnetic resonance, EPR)是唯一能原位、无损地直接跟踪未配对电子及其传递的技术方法, 是研究至少含有一个

图 2 (网络版彩色)呼吸链中的电子传递路径示意图

Figure 2 (Color online) A scheme of electron relay in the respiratory electron transport chain

未配对电子的顺磁性物质的波谱方法^[11,12]。相应地, 不含未配对电子的物质, 称为抗磁性物质。

生理情况下, 还原电子自 NADH 或 FADH₂ 沿着呼吸链传递时, 各个蛋白复合体活性中心(即电子传递体)的化合价会发生从得到电子先降低, 然后失去电子再升高的动态循环。比如, NADH 将电子传递给 FMN, 后者遂还原成 FMN[•]自由基, 反应式是 $\text{FMN}^0 \xrightarrow{-e} \text{FMN}^{\bullet-}$; 接着, FMN[•]将电子传递给铁硫簇后发生氧化反应, 回到初始的可接收电子的状态 FMN, 铁硫簇则化合价下降, 具体过程是 $[\text{2Fe}-2\text{S}]^{2+} \xrightarrow{-e} [\text{2Fe}-2\text{S}]^+$ 或 $[\text{4Fe}-4\text{S}]^{2+} \xrightarrow{-e} [\text{4Fe}-4\text{S}]^+$ 。泛醌 Q(即 Co-Q)得到第一个电子后变成半醌自由基 QH[•], 获得第二个电子后形成 QH₂。类似的还原反应还有细胞色素 c 的 $\text{Fe}^{3+} \xrightarrow{-e} \text{Fe}^{2+}$ 、细胞色素 c 氧化酶的 $\text{Cu}^{2+} \xrightarrow{-e} \text{Cu}^+$ 等(图2)。在此电子传递过程中, 部分活性中心(如 FMN, $[\text{2Fe}-2\text{S}]^{2+}$, $[\text{4Fe}-4\text{S}]^{2+}$)原来是不携带未配对电子的, 会转变成携带未配对电子的活泼中间体(如 FMN[•]自由基、 $[\text{2Fe}-2\text{S}]^+$, $[\text{4Fe}-4\text{S}]^+$ 等); 也有些活性中心(如 Fe^{3+} , Cu^{2+} 等)原来是携带未配对电子的, 会转变成不再携带未配对电子的活泼中间体(如 Fe^{2+} , Cu^+ 等)。利用电子顺磁共振波谱可以直观地检测这些相互转变过程, EPR 信号的变化动态地反映了呼吸链中各个活泼中间体的氧化或还原过程^[13,14]。图3展示了呼吸链中部分代表性的活泼中间产物(如 $[\text{4Fe}-4\text{S}]^+$ 、高/低自旋血红素 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 等)的特征 EPR 模拟谱, 其他电子传递体的 EPR 谱图请参考文献[15~17]。需要指出的是, 还原电子在每个活性中心的滞留时间都非常短, 直至被氧气夺走形成最终产物水才稳定下来。

在呼吸链中, 电子能否高效地传递受到最终电子受体氧气含量的影响和电子传递耦合而形成的跨膜质子动力

势的反馈调节。结合氮氧自由基的自旋标记方法, EPR 还可以检测局部 $p\text{O}_2$, pH 等的动态变化。氧分子是含有两个未配对电子的基态是三重态的顺磁性分子。在溶液中, 已溶解的可自由扩散的氧分子和其他顺磁性分子(如氮氧自由基等)发生碰撞时会发生能量交换, 这种能量交换最终导致 EPR 谱线发生展宽效应。因此, 可以利用氧分子与 3-氨基甲酰基-2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-氧杂自由基(3-carbamoyl-2,2,5,5-tetra-methyl-3-pyrroline-1-yloxy, CTPO)(图4(a))的碰撞而形成的谱线展宽来反映溶液中的 $p\text{O}_2$ 。CTPO 在无氧溶液中的 EPR 谱如图4(b)所示。以中间 $M_I=0$ 超精细分裂峰(图4(c))的强度关系, 即 $K=(b+c)/2a$ 直接反映溶液中的溶氧量和 $p\text{O}_2$ ^[18,19]。此外, 在氮氧自由基中, NO 键的极性能灵敏地反映其氢键的变化, 影响到氮原子的超精细耦合常数的大小: 当氧原子形成氢键或者处于极性溶液中时, 氮原子的超精细耦合常数 A_N 将随之增大; 反之, A_N 将减小。因此, 常利用与 CTPO 结构类似的其他氮氧自由基来检测局部微环境的 pH^[20]。

3 电子传递和单分子顺磁共振

常规 EPR 方法的应用对样品浓度要求比较高, 约为 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 。但是在呼吸链中, 被还原的各个活泼中间体的寿命都非常短, 并且对氧气非常敏感。人体内, 只有少数几个组织或器官会含有较高浓度的比较稳定的顺磁性中间体, 如血液(含有较高浓度的血红素 Fe^{3+})、心脏和肝脏(线粒体含量丰富)。因此, 需要采用灵敏度更高的基于金刚石氮空位中心的单分子磁共振技术^[21], 才能在组织和细胞水平, 甚至单生物分子水平直接跟踪电子传递的动态变化。以金刚石 NV 为核心结构的原子级别探测元件又称为

图3 (网络版彩色)呼吸链中部分活性中心的 9.5 GHz 的特征 EPR 模拟谱。(a) $[\text{4Fe}-4\text{S}]^+$, $g_1=g_2=1.99$, $g_3=2.05$; (b) 低自旋血红素 Fe^{3+} , $g_x=1.43$, $g_y=2.15$, $g_z=3.08$; (c) 高自旋血红素 Fe^{3+} , $g_1=g_2=6.0$, $g_3=2.0$; (d) Cu^{2+} , $g_x=g_y=2.07$, $g_z=2.40$, $A_x=A_y=10$ G, $A_z=180$ G

Figure 3 (Color online) Several representative simulations of the characteristic 9.5 GHz EPR spectra. (a) $[\text{4Fe}-4\text{S}]^+$, $g_1=g_2=1.99$, $g_3=2.05$; (b) low-spin heme Fe^{3+} , $g_x=1.43$, $g_y=2.15$, $g_z=3.08$; (c) high-spin heme Fe^{3+} , $g_1=g_2=6.0$, $g_3=2.0$; (d) Cu^{2+} , $g_x=g_y=2.07$, $g_z=2.40$, $A_x=A_y=10$ G, $A_z=180$ G

图4 CTPO的化学结构(a), 完整的9.5 GHz的特征EPR模拟谱(b)和中间 $M_I=0$ 精细分裂峰的局部放大(c). 超精细耦合常数: $A_N=14.3$ G, $A_H=0.25$ G. (c)中, 无氧时, 可检测到超精细分裂(细线谱); 氧气饱和时, 超精细分裂因展宽而无法分辨(粗线谱)^[18]

Figure 4 The geometric structure of CTPO (a), and its characteristic 9.5 GHz EPR simulation (b), and the highlight of hyperfine splitting of peak $M_I=0$ in the middle of simulation in panel (b) (c). Hyperfine coupling constants are $A_N=14.3$ G and $A_H=0.25$ G. In the panel (c), without oxygen, the hyperfine splitting can be detected (fine line spectrum); with saturated oxygen, the hyperfine splitting cannot be resolved due to line broadening (bold line spectrum)^[18]

NV 量子传感器, 它具有良好的生物兼容性, 已被应用在活细胞水平上的荧光标记^[22]、光磁成像^[23]、温度测量^[24]等. 在生物大分子水平, 单分子磁共振的应用研究也取得了一些进展. 2015年, Shi等人^[25]利用NV传感器(图5(a)), 在室温大气条件下探测到标记在MAD2蛋白分子上的电子自旋信号, 获得了首张单个生物分子的磁共振谱. 一年

后, 哈佛大学Lovchinsky等人^[26]于2016年获取了单个蛋白分子上的小系综核磁共振谱. 2018年, Shi等人^[27]将样品制备条件从被多聚赖氨酸保护的固相推广到常规的缓冲液, 首次采集到了单个系留DNA双链(tethered DNA duplex)的液态顺磁共振谱, 并从数据解析中得到了其在水溶液中的运动信息.

图5 (网络版彩色)利用金刚石NV传感器实现单分子水平的顺磁信号检测和动态研究示意图. (a) NV传感器位于金刚石表面以下数纳米深处, 目标分子以键合方式锚定于金刚石表面. 在电子传递过程中, 目标分子内自旋状态的动态变化可被NV检测, 从而在单分子水平上获取相关生理活动的动力学信息. (b) 当目标分子含有未成对电子而呈顺磁性时, 采用DEER序列扫描射频频率, NV传感器上可以观察到被测分子的EPR谱, 而抗磁性时则检测不到EPR信号. (c) 在电子传递过程中, 目标分子会经历由抗磁性到顺磁性的动态转变, NV传感器上的位于射频频率峰位(图(b))的EPR信号会发生相应的变化

Figure 5 (Color online) A scheme of the NV-based single-molecule EPR detection and the related dynamic study. (a) In this protocol, the NV sensor is embedded in the diamond with a couple of nanometers under surface, and the target molecule is anchored on the diamond surface by chemical bonding. Upon the electron transfer, the dynamic change of the electronic spin state can be monitored by NV sensor. (b) When the target molecule possesses an unpaired electron, the EPR signal can be detected by the NV sensor with DEER pulsed sequence. However, this signal is absent when the molecule is diamagnetic. (c) The dynamic and reversible change between the diamagnetic and paramagnetic states of the target molecule, the EPR signal detected by the NV-sensor has different amplitude, when the RF frequency is fixed at the peak position shown in (b)

根据常规的脉冲电子-电子双共振(double electron-electron resonance, DEER)原理^[28], 可以利用 NV 传感器检测金刚石表面的生物分子自旋标记。在此过程中, 首先对 NV 电子自旋施加哈恩回波(Hahn echo)脉冲序列, 使 NV 自旋发生翻转, 然后再施加使目标自旋发生翻转的脉冲操作。这个脉冲组合, 一方面能通过回波序列滤除环境准静态噪声, 另一方面能使目标自旋的信号得到有效积累。目标自旋的翻转由施加特定频率(0.1~1.4 GHz, 相应的磁场强度为 100~400 G)的作用脉冲实现, 当该作用脉冲的频率与目标自旋匹配时, 可以实现有效翻转, 使 NV 传感器检测到信号; 当两者不匹配时, 则目标自旋无法翻转, 目标自旋的信号在回波序列前后相消。最终, 通过扫频方法即可获得目标自旋的磁共振谱(图 5(b))。

呼吸链是质子耦合的电子传递途径, 电子自 NADH 或 FADH₂ 向下游传递给各个蛋白复合体的活性中心时, 会使这些活性中心的化合价经历从得到电子先降低, 然后失去电子再升高的动态循环过程, 即有些活性中心会由抗磁性转变成顺磁性, 有些则由顺磁性转变成抗磁性。因此, 结合选择性的电子抑制剂或电子受体, 可以检测每个蛋白质复合体的生理活性。基于上述方法可以实现对生物分子

EPR 信号的动态表征。将频率固定在目标自旋的共振频率, 分子反应前没有未配对电子, 处于抗磁性状态, 其共振谱线如图 5(b)中的直线谱, NV 信号如图 5(c)中“反应前”部分, 处于较低的背景水平; 反应发生之后, 分子上产生具有 EPR 信号的未配对电子, 其谱线如图 5(b)中曲线谱所示, NV 信号将如图 5(c)中“反应后”所示处于较高水平。因空间位置和自旋属性的差异, 不同活性中心与 NV 的相互作用也存在差异, 最终导致 NV 信号差异。这是可以提供在单分子水平上监测生物化学反应时间, 分析不同反应阶段动态特点等的全新表征方法。

4 展望

电子顺磁共振波谱在生命科学应用研究中已取得了许多重要进展, 与此同时, 我们也观察到本领域研究水平参差不齐, 这与本领域尚缺乏较高水平的紧跟研究前沿的中文综述和专著有着非常密切的关系。因此, 相关领域研究人员今后仍需共同努力, 推动该交叉学科不断向前发展。单分子磁共振的发展和应用不但可以打开新的观测窗口, 揭示生命机理的独特信息, 更有可能为药物筛选、个性化医疗等重大应用开辟全新的超灵敏检测手段。

致谢 感谢国家自然科学基金(81788101, 31700744, 11761131011)、国家重点研发计划(2018YFA0306600)和合肥物质科学技术中心方向项目培育基金(2018ZYFX003)资助。

推荐阅读文献

- Ort D R, Yocum C F, Heichel I F. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Dordrecht: Springer, 1996
- Jonathan P H, Ferguson-Miller S, Mills D A. Energy transduction: Proton transfer through the respiratory complexes. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 165-187
- Ward D M, Cloonan S M. Mitochondrial iron in human health and disease. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81: 453-482
- Dromparis P, Michelakis E D. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75: 95-126
- Zuo M X. Human and Animal Physiology (in Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2016. 167-266 [左明雪. 人体及动物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2016. 167-266]
- Zhu S G, Xu C F. Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2017. 49-125 [朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2017. 49-125]
- Sazanov L A. A giant molecular proton pump: Structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 375-388
- Harris J R, Boekema E J. Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Singapore: Springer Nature, 2018
- Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. Proton-pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 205-223
- Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 515-549
- Saifutdinov R G. Electron Paramagnetic Resonance in Biochemistry and Medicine. New York, London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001
- Abragam A, Bleaney B. Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions. Oxford: Oxford University Press, 2012
- Trubitsin B V, Ptushenko V V, Koksharova O A, et al. EPR study of electron transport in the cyanobacterium *synechocystis* SP PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg*, 2005, 1708: 238-249
- Eaton S S, Eaton G R, Berliner L J. Biomedical EPR. New York, London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004

- 15 Miller A F, Brudvig G W. A guide to electron-paramagnetic resonance spectroscopy of photosystem- II membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1056: 1–18
- 16 Hanson G, Berliner L J. *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes*. New York, London: Springer, 2010
- 17 Hanson G, Berliner L J. *High Resolution EPR: Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine*. New York, London: Springer, 2009
- 18 Lai C S, Hopwood L E, Hyde J S, et al. ESR studies of O₂ uptake by chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 1166–1170
- 19 Hyde J S, Subczynski W K. Simulation of ESR spectra of the oxygen-sensitive spin-label probe ctpo. *J Magn Res*, 1984, 56: 125–130
- 20 Gilbert B C, Murphy D M, Chechik V. *Electron Paramagnetic Resonance*. London: The Royal Society of Chemistry, 2011. 71–106
- 21 Doherty M W, Manson N B, Delaney P, et al. The nitrogen-vacancy colour centre in diamond. *Phys Rep*, 2013, 528: 1–45
- 22 Mochalin V N, Shenderova O, Ho D, et al. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 11–23
- 23 Le Sage D, Arai K, Glenn D R, et al. Optical magnetic imaging of living cells. *Nature*, 2013, 496: 486
- 24 Kucsko G, Maurer P C, Yao N Y, et al. Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature*, 2013, 500: 54
- 25 Shi F Z, Zhang Q, Wang P F, et al. Single-protein spin resonance spectroscopy under ambient conditions. *Science*, 2015, 347: 1135–1138
- 26 Lovchinsky I, Sushkov A O, Urbach E, et al. Applied physics nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. *Science*, 2016, 351: 836–841
- 27 Shi F, Kong F, Zhao P, et al. Single-DNA electron spin resonance spectroscopy in aqueous solutions. *Nat Methods*, 2018, 15: 697–699
- 28 Schweiger A, Jeschke G. *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*. Oxford: Oxford University Press, 2001

Summary for “线粒体呼吸链的电子顺磁共振”

Mitochondria respiratory chain studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy

Jieli Mao¹, Qi Zhang^{1,2}, Fazhan Shi^{1,2}, Jihu Su^{1,2*} & Jiangfeng Du^{1,2}

¹ Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Microscale Magnetic Resonance, Department of Modern Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

² Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

* Corresponding author, E-mail: sujihu@ustc.edu.cn

Aerobic respiration is the indispensable physiology of higher organism living on earth, since the required energy for biological activities is supplied mainly by this metabolism. It is well established that mitochondria plays an important role in converting the stable chemical energy stored in foods into the active and utilizable energy supplying to life activities. Upon the process, the energy conversion is carried out by the respiratory electron transport chain, which consists of five distinct and coupled protein complexes (termed complex I–V) embedded in the mitochondria intima. Among them, complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), III (cytochrome *bc*₁) and IV (cytochrome *c* oxidase) are the electron-coupled proton-pumping enzymes. Except for the complex V (i.e., ATP synthase), each complex has several redox cofactors to promote the electron transfer within themselves, and the transfer from complex I and II to complex III is shuttled by membrane-embedded ubiquinones, from complex III to IV by the soluble cytochrome *c*. When the reductive electron is donated by the initial donors NADH or FADH₂ to the final acceptor molecular oxygen O₂, a transmembrane proton motive force is formed simultaneously. The latter is the driving force for the ATP synthesis via ATP synthase with a ratio of three protons per ATP. All the aforementioned processes are also known as oxidative phosphorylation, and the arrangement of the electron carriers therein is called as respiratory electron transport chain. In the stepwise electron relay, these carriers undergo the redox changes, giving rise to the respective paramagnetic and diamagnetic spin states. These single-electron relays are prone to the electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), which is a powerful and noninvasive technique to monitor the unpaired electron *in situ*. As shown in the overwhelming literatures, EPR technique has been adopted to reveal the electron transfer pathway in different biological activities. Herein, the application of EPR to study the dynamic electron transfer in mitochondria is reviewed briefly. However, this conventional application required rather high concentration of the active center at a level of 1–10 μmol/L. Actually, most of the intermediates of the electron carriers are very active and short-life. In the human body, only a few tissues can accumulate such required concentration of paramagnetic substances, e.g., in blood, heart and liver. For the past decade, a more sensitive single-molecule magnetic resonance technique based on the nitrogen-vacancy (NV) center of diamond has been developing dramatically. In principle, this advanced EPR technique requires the less sample or concentration, even down to the single biomolecule, and provides the time-resolved dynamic information. Lately, the studies of single-biomolecule EPR at room temperature or in aqueous solution have been reported consecutively in single protein (MAD2/mitotic arrest deficient-2) and single DNA (tethered DNA duplexes). Finally, a perspective of single-biomolecule magnetic resonance technique is given for the further study on mitochondrion and relative physiological activities. The single molecule EPR technique is also helpful to unveil the other specific information of biological processes, for example, drug screening, personalized medicine and other major applications.

electron transfer, respiratory electron transport chain, electron paramagnetic resonance, diamond nitrogen-vacancy center, single-molecule magnetic resonance technique

doi: 10.1360/TB-2019-0348