

细胞色素 b_5 若干表面荷负电残基突变体蛋白的制备及初步表征

王韵华^① 王文虎^① 任毅^① 陆君霞^① 顾少华^② 谢毅^② 黄仲贤^{①*}

(^①复旦大学化学系化学生物实验室, 上海 200433; ^②复旦大学生命科学院遗传学研究所, 上海 200433.)

*联系人, Email: zxhuang@fudan.edu.cn)

摘要 用寡聚核苷酸诱导定点突变方法, 将细胞色素 b_5 血红素暴露边周围的负电荷残基用疏水性丙氨酸残基取代, 得到 7 种双点和多点突变的细胞色素 b_5 蛋白. 基因碱基序列测定以及蛋白质分子量测定结果都表明突变正确. 突变体蛋白的光谱电化学研究结果表明, 它们的表观还原电位发生了 2~10 mV 的正向移动. 突变体蛋白的整体结构没有明显变化, 为进一步研究蛋白表面电荷的作用奠定了基础.

关键词 细胞色素 b_5 定点突变 表面负电荷 氧化还原电位

细胞色素 b_5 是肝细胞内质网上的一种膜结合血红素蛋白, 普遍存在于哺乳动物及其他生物体内. 在细胞内质网中, 它参与脂肪酸脱饱和反应, 也是许多细胞色素 P450 水化反应中的电子给予体. 在血液红细胞中, 细胞色素 b_5 以可溶性形式存在, 与细胞色素 b_5 还原酶一起, 还原其中的高铁血红蛋白(methemoglobin), 以保持血红蛋白的生理活性. 细胞色素 b_5 膜蛋白的可溶性部分, 既可以用胰蛋白酶水解获得, 也可以由基因在大肠杆菌 *E. coli* 中表达产生, 它们均能保持蛋白质完整的生物活性. 为此, 可以运用基因定点突变技术得到细胞色素 b_5 的突变体蛋白, 满足于各种目的的研究. 所以, 细胞色素 b_5 也是研究重要生物、化学问题的一个理想蛋白质模型体系.

在生物体内, 现已明确细胞色素 b_5 参与的重要反应之一是传递电子. 大量的研究表明, 电子传递反应受到两个蛋白金属活性中心的距离、热力学驱动力、分子识别以及中间态的性质等多种因素的调制. 然而这些因素本质上取决于蛋白质的一级结构和高级结构、蛋白质的溶液构象以及蛋白-蛋白、蛋白-溶剂分子间的相互作用等. 因此, 生物体内电子传递反应与这些因素之间的复杂关系的研究, 已受到了人们的高度关注.

从细胞色素 b_5 的三维结构中可以注意到, 高度保守的 Glu44, Glu48, Glu56, Asp60 等残基, 均匀地分布在血红素暴露边的两边, 在生理 pH 条件下, 这些残基构成了蛋白表面的负电荷密集区^[1]. 已有的 cyt *c*/cyt b_5 电子传递反应的实验和理论研究都认为, 细胞色素 b_5 的这一区域, 在分子识别和电子传递中发挥了重要作用, 它们主要以静电相互作用的方式, 对电子传递前体络合物的生成作出了贡献^[2-3]. 但是在这些相互作用中, 每个残基的作用方式和贡献是否相同? 血红素两边的负电荷分布是否对称? 这一负电荷密集区域在蛋白的识别与结合中是否必需? 血红素暴露边是否是细胞色素 b_5 传递电子的惟一通道等等, 是非常有必要阐明的问题. 人们对这一区域中 Glu56 表面残基在细胞色素 b_5 与细胞色素 *c* 的电子传递中的作用的认知存在分歧, 我们运用寡聚核苷酸介导的基因定点突变方法, 将细胞色素 b_5 Glu44 和 Glu56 位上的负电荷残基用疏水性残基 Ala 替换, 获得了细胞色素 b_5 E44A, E56A 和 E44/56A 突变体蛋白^[4]. 首先在 NMR 研究结果显示出突变体蛋白的溶液整体结构和构象未发生明显变化的前提下, 用各种实验证实了 Glu56 残基与 Glu44 残基一样, 以多种动态的模式也参与了与细胞色素 *c* 之间的电子传递相互作用^[5]. 然而, Glu56 的这些作用是否受到这一区域其他负电荷的调制? 在血红素暴露于溶剂的负电荷面的静电势是否影响

蛋白间的电子传递? 电荷的多寡和它们的位点有什么关系? 它们之间是否存在整体的协同作用等等? 为了进一步阐明这些问题, 我们在以前工作的基础上, 将 Glu48 和 Asp60 残基再用 Ala 取代, 得到多种单点、双点和多点表面荷负电残基突变的蛋白, 然后考察各个负电荷残基在调节电子传递反应热力学性质和动力学性质中的作用及它们的整体作用, 获取有关细胞色素 b_5 电子传递通道以及反应机制的信息. 本文报道了这些细胞色素 b_5 蛋白基因的定点突变及其在 *E. coli* JM83 中的表达、蛋白质的纯化, 以及突变体蛋白的分子量和条件标准还原电位等基本性质的表征.

1 材料与方法

(i) 材料. T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 等均购自 NEW ENGLAND Biolabs 公司. $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 购自 Amersham 公司. 含有合成细胞色素 b_5 基因(编码牛肝线粒体细胞色素 b_5 82 个残基的水溶性结构域)的 pUC19 质粒由加拿大 British Columbia 大学 A. G. Mauk 教授惠赠. 其他的生物试剂均购自 Sigma 公司, 所有的化学试剂均为分析纯.

(ii) 方法. (1) 基因定点突变. 除特别说明外, 基因的定点突变及其他的 DNA 操作均按 Sambrook 等人^[6]的方法进行. 我们合成了两个 21 个碱基长的寡聚核苷酸引物, 分别将 E48(GAA) 改变为 A48(GCG); D60(GAC) 改变为 A60(GCG). 为了提高效率, 我们将引物等摩尔混合后, 分别与克隆了野生型, E44A, E56A 以及 E44/56A 基因的 M13 噬菌体单链 DNA 进行杂交和体外合成, 这一个过程同时得到了 48 或 60 位单点以及 48 和 60 位双点突变的基因. 从 M13 mp18 RF DNA 中得到目标突变基因, 转接到 pUC19 质粒, 并转染 *E. coli* JM83. (2) 蛋白质的表达与纯化. 蛋白的表达与纯化按文献^[7]的方法进行. 收集 $A_{412}/A_{280} > 5.7$ 的组分, 用 Amicon 超滤器浓缩并多次脱盐, 至磷酸缓冲液浓度小于 1 mmol/L 后将蛋白溶液进行冷冻干燥. (3) 蛋白质分子量测定. 固体蛋白样品用 1:1 (体积比)甲酸和 0.1% 乙酸混合水溶液溶解, 蛋白样品终浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 用注射器直接将样品注入 ESI 电离源, 进样速度为 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. 测量前用肌红蛋白标准样品做静态和动态质量校正. (4) 蛋白质氧化还原电位测量. 用光谱电化学方法测定蛋白质的表观还原电位 E^0 . 金网光透薄层电极(OTTLE, 160 wires/cm)为工作电极, 铂电极为辅助电极, 饱和甘汞电极(+242 mV,

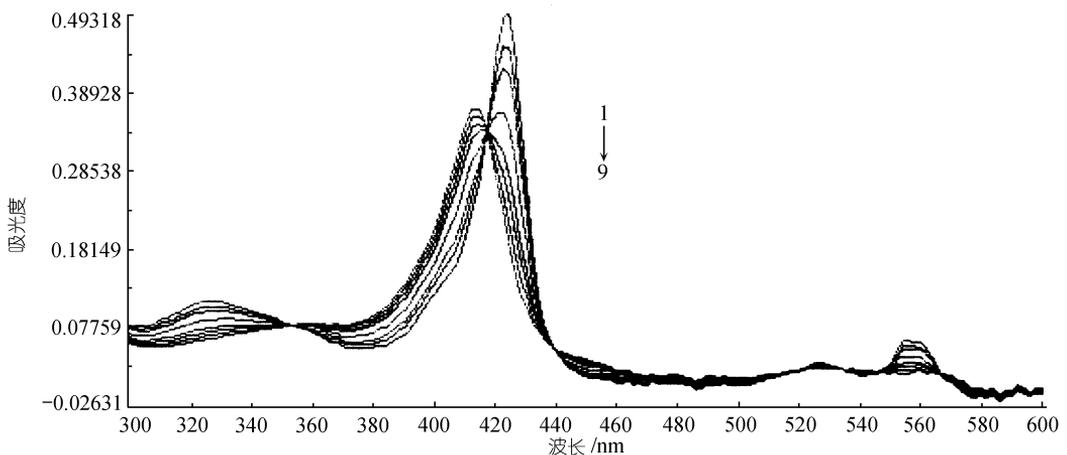


图1 细胞色素 b_5 E48A/D60A 在 Au-OTTLE 上的薄层光谱
曲线 1~9 的外加电位分别为: -360, -38, -18, -3, 12, 27, 47, 67, 60 mV (vs. SHE)

vs. SHE)为参比电极. 按文献[8]的方法, 用 ZF-3 型恒电位仪调节外加电压, 在 HP8452A 型紫外-可见分光光度计上记录每一外加电压下的吸收光谱(如图 1), 读出 424 nm 处的吸光度 A , 根据方程 $E_{App} = E^{0'} + RT/nF \ln (A_R - A)/(A - A_O)$ (其中 A_R 为完全还原态的吸光度, A_O 为完全氧化态的吸光度)进行拟合(如图 2), 得到表观还原电位 $E^{0'}$.

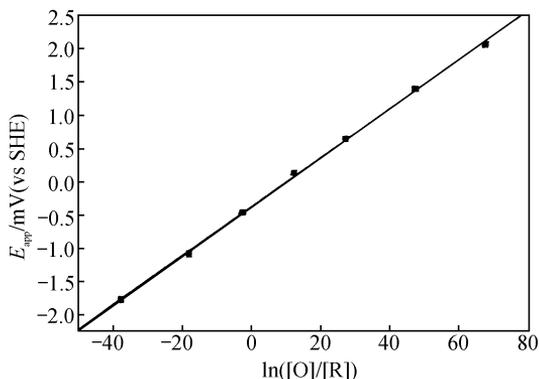


图 2 由图 1 数据得到的 $E_{app} - \ln[(A_R - A)/(A - A_O)]$ 图

2 结果与讨论

我们在以前工作^[7]的基础上, 分别以细胞色素 b_5 野生型以及 E44A, E56A, E44/56A 突变体的 M13 mp18 单链 DNA 为模板, 用寡聚核苷酸介导诱变, 将 48 位和 60 位的残基再一次定点突变, 获得了 E44/48/56A/D60A, E44/48/56A, E44/56A/D60A, E48/56A/D60A, E44/48A, E48/56A, E48A/D60A, 44A/D60A 和 E44/48A/D60A 等 9 种突变基因. 突变基因测序结果中的部分碱基序列见图 3. 突变基因在 *E. coli* JM83 中的表达, 在相同的表达条件下呈现明显的差异. 其一, E44/48A/D60A 和 E44A/D60A 基因未能表达得到含血红素 b 的完整蛋白; 其二, 突变基因的蛋白表达量不同, 大部分突变基因的表达量都明显高于野生型, 其中 E44/48/56A/D60A 为最高, 每升培养基可得到 24 mg 纯蛋白, 是野生型细胞色素 b_5 (每升培养基 15 mg) 的 1.3 倍左右. 突变体蛋白表达量的增加, 可能与突变后蛋白肽链的疏水自由能增大有关. 按 Caffrey 等人^[9]的方法进行计算, 谷氨酸残基用丙氨酸取代后, 疏水自由能可增加 0.3 kJ/mol; 天冬氨酸用丙氨酸取代后, 疏水自由能可增加 0.9 kJ/mol. 所以当 Glu44, Glu48, Glu56 和 Asp60 四个残基同时用 Ala 取代后, 疏水自由能有较大幅度的增加(约 1.8 kJ/mol 左右), 它们可能使得蛋白肽链更加稳定, 因而使产量明显增加. 我们在突变体蛋白稳定性研究中得到的结果与这一理论计算结果一致, 每种突变体蛋白的稳定性均有提高, 但每个位点的突变对增加蛋白稳定性的贡献可能不等(未发表的结果). 至于为什么未能获得 E44/48A 和 E44/48A/D60A 完整蛋白的原因目前尚不清楚, 有待于结合其他实验结果进一步研究.

5'-(GCT)GTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACT(GCT)AACTTTGAG(GCG)-3'
 5'-(GCT)GTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACT(GCT)AACTTTGAGGAC-3'
 5'-(GCT)GTCCTGCGCGAACAGGCCGGCGGTGACGCGACT(GCT)AACTTTGAG(GCG)-3'
 5'-GAAGTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACT(GCT)AACTTTGAG(GCG)-3'
 5'-(GCT)GTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACTGAAAACTTTGAGGAC-3'
 5'-GAAGTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACT(GCT)AACTTTGAGGAC-3'
 5'-GAAGTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACTGAAAACTTTGAG(GCG)-3'
 5'-(GCT)GTCCTGCGC(GCG)CAGGCCGGCGGTGACGCGACTGAAAACTTTGAG(GCG)-3'
 5'-(GCT)GTCCTGCGCGAACAGGCCGGCGGTGACGCGACTGAAAACTTTGAG(GCG)-3'

图 3 9 种细胞色素 b_5 突变基因的部分 DNA 序列

从第 44 位至 60 位, 括号内碱基代表突变碱基

表1 细胞色素 b_5 及其突变体蛋白的分子量和 25°C 的 $E^{0'}$

细胞色素 b_5	理论计算值	实验测量值 ^{a)}	表观还原电位 $E^{0'}$ /mV ^{b)}	$\Delta E^{0'}$ ($E^{0'}_{WT} - E^{0'}$)
野生型(WT)	9 461.4	9 462.0	5	-
E44/48/56A/D60A	9 243.3	9 244.9	15	10
E44/48/56A	9 287.3	9 287.7	12	7
E44/56A/D60A	9 301.3	9 301.9	8	3
E48/56A/D60A	9 301.3	9 301.5	13	8
E44/48A	9 345.3	9 346.0	10	5
E48/56A	9 345.3	9 344.5	8	3
E48A/D60A	9 359.3	9 359.8	7	2

a) 测量误差均小于 ± 2 个质量单位; b) 测量误差 ± 3 mV

用电喷雾质谱方法测得的突变体蛋白分子量列于表 1 中。从中可以看到, 每个突变体蛋白分子量的测量值和理论值完全一致, 表明我们成功地进行了定点突变和蛋白的纯化。这些蛋白可以用于我们设计的各种后继实验研究中。

表 1 还列出了突变体蛋白在 pH = 7.0, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 25°C 的表观还原电位。从表中可以看到, 所有突变体蛋白的电位与野生型相比, 分别向正方向移动了 2~10 mV。我们曾经总结过影响细胞色素 b_5 氧化还原电位的 4 个主要因素¹⁾, 即血红素 b 的轴向配体以及介质阳离子与血红素 b 丙酸根的相互作用, 血红素 b 附近的残基与它的相互作用, 血红素 b 暴露边周围的静电势, 以及血红素 b 疏水袋的疏水性。然而, 当我们把蛋白表面带电荷残基用电中性的残基取代时, 除了静电势有些改变, 基本上没有涉及上述其他性质的变化, 因此突变体蛋白的氧化还原电位仅有一个微小的移动。这些结果与我们以前报道的 E44A, E56A 和 E44/56A 的结果一致^[8], 也再次证实了我们以前的结论是正确的。在细胞色素 b_5 中, Glu44, Glu48, Glu56 和 Asp60 均位于血红素暴露边的周围, 这些残基的负电荷被中和之后, 可能不利于氧化态蛋白中 +3 价态的铁的正电荷分散, 比还原态蛋白中 +2 价态的铁更不稳定, 因此电位向正方向移动了。同时, 这些表面的残基被突变后, 没有对血红素疏水袋内环境产生明显影响, 仅使血红素疏水袋与血红素之间的疏水相互作用稍有增加, 所以电位发生很小的正向移动。将多点突变(如 E44/48/56A/D60A)和双点突变蛋白(如 E44/48A, E48/D60A)的氧化还原电位进行比较后可以发现, 表面负电荷对电位的作用基本上是简单的累加, 与负电荷分布的对称性可能没有明显的关系。氧化还原电位的改变也经常是蛋白结构扰动的有效探针, 这些突变体蛋白氧化还原电位的微小变化表明, 蛋白表面荷负电残基突变后, 没有引起蛋白的整体结构、特别是血红素疏水袋内环境的变化。所有突变体蛋白氧化态和还原态的紫外可见吸收光谱与野生型蛋白完全相同(图未列出), 也证实了这一结论。这些结果都表明, 突变体蛋白除表面电荷数与野生型蛋白有区别外, 它们的结构基本上保持一致, 这为我们进一步研究、阐明各个负电荷残基及其分布与蛋白之间的识别、结合以及电子传递的关系奠定了基础。

致谢 本工作作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 29731030)。

1) Wang Z Q, Wang Y H, Qian W, et al. Is residue proline-40 essential for the protein structure, stability and functions of cytochrome b_5 ? Biochemistry, 2000(待发表)

参 考 文 献

- 1 Mathews F S, Levine M, Argos P. Three-dimensional Fourier synthesis of calf liver cytochrome b_5 at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1972, 64: 449~464
- 2 Salemme F R. A hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochrome c and cytochrome b_5 . *J Mol Biol*, 1976, 102: 563~568
- 3 Northrup S H, Thomasson K A, Miller C M, et al. Effects of charged amino acid mutation on the bimolecular kinetics of reduction of yeast iso-1-ferricytochrome c by bovine ferrocycytochrome b_5 . *Biochemistry*, 1993, 32: 6613~6623
- 4 Sun Y L, Wang Y H, Yi X, et al. The influence of Glu44 and Glu56 of cytochrome b_5 on the protein structure and interaction with cytochrome c. *Protein Eng*, 1996, 9: 555~558
- 5 Sun Y L, Wang Y H, Yan M M, et al. Structure, interaction and electron transfer between cytochrome b_5 , its e44A and/or E56A mutants and cytochrome c. *J Mol Biol*, 1999, 285: 347~359
- 6 Sambrook J, Fritsch E P, Maniatis T. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 孙雨龙, 王韵华, 周刚, 等. 细胞色素 b_5 Glu44, Glu56 的定点突变和蛋白质结构比较. *高等学校化学学报*, 1996, 17: 1673~1677
- 8 Wang Y H, Cui J, Sun Y L, et al. The direct electrochemistry of cytochrome b_5 and its mutant proteins. *J Electroanal Chem*, 1997, 428: 39~45
- 9 Caffrey M S. Strategies for the study of cytochrome c structure and function by site-specific mutagenesis. *Biochimie*, 1994, 76: 622~630

(2000-05-17 收稿, 2000-07-26 收修改稿)