细胞色素 c 氧化酶可溶性 Cu_A 结构域的表达、分离纯化和初步表征

李连之^① 宋爱新^① 谢毅^② 黄仲贤^{①*} E. de Waal^③ U. Kolczak^③
G. W. Canters^③

(^①复旦大学化学系化学生物学实验室, 上海 200433; ^②复旦大学生命学院遗传学国家重点实验室, 上海 200433; ^③Leiden Institute of Chemistry, Leiden University, P O Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands. * 联系人, E-mail: zxhuang@fudan.edu.cn)

摘要 细胞色素 c 氧化酶亚基 II 含有可溶性双核铜中心 Cu_A 结构域蛋白. 报道了 *Paracoccus versutus* 菌 Cu_A 结构域的基因克隆、表达和分离纯化及其初步表征. 编码 Cu_A 结构域的基因插入 pET11d 质粒载体中, 于 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达. 结果表明, Cu_A 结构域蛋白在这个表达体系中主要以包涵体的形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 10% 左右. 经尿素溶解, Cu⁺/Cu²⁺ 重组复性, Q-Sepharose 快速阴离子交换柱和 Sephadex-G75 凝胶过滤柱纯化, 得到了电泳纯的紫红色可溶性蛋白. 紫外-可见吸收光谱在 478 nm 有较强吸收峰, 530 nm 处有一肩峰, 在 360 和 806 nm 处有弱吸收峰, 它们可归属为混价双金属核中心 (Cu₂S₂R₂) 中 Cu-S 和 Cu-Cu 间的电荷转移与轨道相互作用. 圆二色谱表明其二级结构主要为 β-折叠形式. 荧光激发谱最大波长为 280 nm, 发射谱最大波长为 345 nm.

关键词 细胞色素 c 氧化酶 Cu_A 结构域蛋白 基因表达 分离纯化 光谱性质

细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, CcO) 是真核生物线粒体内膜和需氧菌细胞膜电子传递链上的终端酶. 它催化细胞色素 c 到氧分子 (O₂) 的电子传递, 使氧分子还原为水分子, 并与质子泵功能相偶联. 在传递电子的同时, 伴随着质子由线粒体内膜基质一侧泵向胞浆一侧, 由此产生的 H⁺ 电化学梯度用来合成 ATP, 催化反应式如下:

细胞色素 c 氧化酶是由多亚基组成的复杂酶分子. 大量研究表明^[1-3], 其催化核心亚基 Sub I 中含有 heme a, heme a₃-Cu_B 金属中心结构, 核心亚基 Sub II 中含有 Cu_A 的双核金属中心结构. Sub II 中的可溶性 Cu_A 结构域是接受来自细胞色素 c 电子传递的初始受体, 然后, 它将电子依次传递给 heme a 和 heme a₃-Cu_B, 最后, 在 heme a₃-Cu_B 双金属核中心把氧分子还原为水分子. Cu_A 结构域是一个高度离域化的混价 (+1.5) 双核结构, 两个铜离子之间由两个 Cys-S⁻ 桥联起来, 这是生物体系中的一种新颖的化学结构. 近几年来流行病学研究发现, CcO 与线粒体疾病间存在着明显的相关性^[4,5], 如大多数老年性痴呆症 (Alzheimer's Disease) 病人的 CcO 异常, 主要表现为氨基酸的改变和全酶装配错误. 为进一步研究 CcO 电子传递的分

子机理、探讨氨基酸的突变对 CcO 的结构 (构象)、性质、功能的影响, 并为阐明线粒体疾病病理过程的分子基础提供证据, 本文报道了利用基因工程技术和生物化学方法, 对 CcO 可溶性 Cu_A 结构域进行基因克隆、表达和分离纯化及其初步表征的研究.

1 实验

(i) 仪器与材料、试剂. Jasco J-715 型圆二色谱仪, HP8453 UV-Vis 分光光度计 (HP8453 Diode Array Spectro-photometer, USA), Cary Eclipse 荧光分光光度计 (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer).

Paracoccus versutus 细菌 CcO 可溶性 Cu_A 结构域基因克隆在 Leiden University Gerard W. Canters 教授实验室完成. *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保存, 限制性内切酶 *Nco* I (New England BioLabs) 和 *Bam* H I (New England BioLabs)、胰蛋白酶 (日本制药株式会社)、酵母提取物 (Unipath Ltd., England)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (Sigma)、二硫苏糖醇 (DTT) (Canada 分装, 上海生工生物工程有限公司)、Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech)、Sephadex G-75 (Sigma), 其他试剂均为分析纯或生化试剂.

(ii) Cu_A 结构域基因克隆. 质粒的抽提与纯化、基因序列测定、感受态细胞的制备、新鲜转化子的制备均按常规分子生物学方法进行^[6].

(iii) Cu_A 结构域表达与纯化^[7]. 将 *Paracoccus versutus* 细菌的 CcO 可溶性 Cu_A 结构域基因重组于质粒 pET11d 载体上, 酶切位点为 *Nco* I 和 *Bam*H I, 然后转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 在含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基上进行培养, 并筛选含有该基因的单菌落. 挑取单菌落接种于小量 LB (Amp) 液体培养基, 于 200 r/min, 37℃ 培养 3 h 后, 按 1% 转接于另一大量 LB (Amp) 液体培养基中, 200 r/min, 37℃ 培养 3~4 h 后待 $A_{600\text{ nm}} = 0.4\sim 0.6$ 左右时, 用 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 诱导 2.5 h 后收集细胞, 用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 洗涤.

将 *E. coli* 细胞悬浮于含 0.15 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 5 mmol/L 苄咪的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 标准缓冲液中, 加入溶菌酶和 DNA 酶搅拌、冰浴破碎细胞. 悬浮物于 15000 r/min, 4℃ 下离心 40 min. 弃去上清液, 将沉淀物悬浮于含 3% (质量体积比) Triton X-100 的上述标准缓冲液中, 冰浴 2 h 后, 再将悬浮物离心, 把包涵体与可溶性膜蛋白分离开. 沉淀物用含 1% Triton X-100 的上述标准缓冲液洗涤.

将沉淀物溶解在含 6 mol/L 脲的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液中, 溶解的蛋白先对 2 mol/L 脲, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2), 0.5 mmol/L DTT 透析 4 h, 然后对 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2), 0.5 mmol/L DTT 透析 4 h, 再对 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2), 200 $\mu\text{mol/L}$ CuCl 透析过夜. 最后对 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2), 200 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 透析 4 h. 透析上清液上 Q-Sepharose 快速阴离子交换柱, 此柱用含 200 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 平衡. 用 0~1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱. 收集 Cu_A 结构域蛋白流分. 超滤浓缩后上 Sephadex G-75 凝胶过滤柱, 该柱用含 50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 的 20 mmol/L BisTris-HCl (pH 7.0) 预先平衡, 收集 Cu_A 结构域蛋白流分. 所有柱操作均在 4℃ 下进行.

(iv) Cu_A 结构域蛋白初步表征. SDS-PAGE 凝胶电泳采用文献[6]方法, 电泳后用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色. UV-Vis 吸收光谱测量, 蛋白溶于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$. 圆二色谱 (CD) 测定时光源系统用 N_2 保护 (流量为 5 L/min), 蛋白溶于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 浓度为 16 $\mu\text{mol/L}$, 样品池的光径为 0.1 cm. 测量参数为: 扫描速率 100 nm/min, 分辨率 0.2 nm, 响应时间 0.25 s. 荧光光谱测量, 蛋白溶于 20 mmol/L Tris-HCl

(pH 7.5) 缓冲液中, 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$. 激发光和发射光的狭缝均为 5 nm, 测量激发光谱时固定发射波长为 345 nm, 扫描范围为 250~320 nm. 测量发射光谱时固定激发波长为 280 nm, 扫描范围为 290~500 nm.

2 结果与讨论

2.1 Cu_A 结构域的基因克隆与表达

对 *Paracoccus versutus* 细菌 CcO 可溶性 Cu_A 结构域基因进行了序列测定, 该基因由 462 bp 核苷酸组成 (包括起始密码子 ATG), 它编码亚基 Sub II 中 128~280 位氨基酸. 理论计算 Cu_A 结构域蛋白的分子量为 17248.6 u. 由 SDS-PAGE (图 1) 测得其分子量约为 17500 u 左右, 与之基本相符. 将 Cu_A 结构域基因重组于质粒 pET11d 载体 (酶切位点为 *Nco* I 和 *Bam*H I) 后转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 在含 Amp 的 LB 培养基上进行培养、筛选和基因表达. 对表达条件进行了优化, 实验表明, 该基因表达的一个关键性问题是只有新鲜转化子才能进行高效表达. 不同浓度的 IPTG 诱导实验表明, 在 0~1 mmol/L 的浓度范围内, IPTG 浓度为零 (即无诱导) 时也有微弱表达 (图 1 泳道 1), 当 IPTG 浓度大于 0.2 mmol/L 后, 其表达量不再随 IPTG 浓度的增加而增大. 由图 1 泳道 2 可知, Cu_A 结构域蛋白的表达量占细胞总蛋白量的 10% 左右. 由图 1 泳道 3, 4 可以看出, 在破菌液的上清液中只有很少量的目标蛋白, 而绝大部分表达产物存在于沉淀中, 即 Cu_A 结构域蛋白在此表达条件下主要是以包涵体的

图 1 Cu_A 结构域蛋白表达和各纯化步骤的 SDS-PAGE 图 1 示含基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌全细胞裂解液; 2 示含基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌全细胞裂解液, 0.2 mmol/L IPTG 诱导; 3 示表达菌全细胞裂解液离心上清液; 4 示表达菌全细胞裂解液离心沉淀物; 5 示纯化的包涵体; 6 示 Q-Sepharose 柱层析样品; 7 示 Sephadex G-75 凝胶过滤后样品; 8 示蛋白质标准分子量

形式存在于菌体细胞中.

2.2 Cu_A 结构域的分离与纯化

用表达菌进行大量发酵, 每 4 升液体 LB 培养基得到约 8.2 g 湿菌体. 经破菌离心得到包涵体和膜蛋白的悬浮物, 然后用表面活性剂 Triton X-100 溶解洗涤, 去除膜蛋白后得到包涵体沉淀, 由图 1 泳道 5 中清楚地看到包涵体中绝大部分膜蛋白已被除去且杂蛋白的含量已很少. 在这种状态下 Cu_A 结构域蛋白是以脱辅因子形式存在的, 脲素变性使包涵体溶解后对不同的缓冲液透析, 在 DTT 作用下, 使蛋白质中的半胱氨酸还原为游离 Cys-SH 的形式, 加入 Cu⁺, Cu²⁺后可进行 Cu_A 结构域蛋白的重组复性, 此时可以观察到蛋白溶液变为紫红色. 用强碱性阴离子交换树脂 Q-Sepharose 柱纯化该蛋白, 用 NaCl 线性梯度洗脱, 紫红色的 Cu_A 结构域蛋白在 NaCl 浓度为 0.45 mol/L 时被洗脱下来, 再经 Sephadex G-75 柱凝胶过滤后, 得到了纯度 95% 以上的紫红色可溶性 Cu_A 结构域蛋白(图 1 泳道 7, 8).

2.3 Cu_A 结构域的初步表征

图 2 是 Cu_A 结构域蛋白在 Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液中的紫外可见吸收光谱. 由图可知, 在 478 nm 处有一较强吸收峰, 530 nm 处有一肩峰, 而且在 360 和 806 nm 处有弱吸收峰. 在完整的 CcO 中, 仅能观察到相应于 806 nm 处的弱吸收峰, 而观察不到 Cu_A 结构域蛋白的其他吸收峰, 这是由于在完整的 CcO 中, 这些谱带被血红素(heme a 和 heme a₃)的强吸收带覆盖所致. Cu_A 结构域蛋白与以前所知的蓝铜蛋白的吸收光谱不同, 蓝铜蛋白在 600 nm 附近有配体到金属的电荷转移(LMCT)吸收峰. 然而, Cu_A 结构域蛋白的吸收光谱类似于 N₂O 还原酶^[8]和 *Paracoccus*

denitrificans 菌中 Cu_A 结构域的吸收光谱^[7]. Cu_A 是一个混价态[Cu^{+1.5}-Cu^{+1.5}]的双核中心, 2 个 Cu²⁺由 2 个半胱氨酸(Cys)的巯基桥联, Cu²⁺和 Cys 的 S 处于同一平面上, 每个 Cu²⁺的配体形成一个扭曲四面体. 这些吸收峰可归属为混价双金属核中心(Cu₂S₂R₂)中 Cu-S 和 Cu-Cu 间的电荷转移与轨道相互作用^[9]. 研究表明^[1,2,9], 它是生物体系中一种新颖的化学结构, 不同于以往所知的蓝铜蛋白结构.

图 3 是 Cu_A 结构域蛋白在 Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液中的远紫外圆二色散谱. 从图中可知, 在 213 nm 处有一明显负吸收峰, 这说明它主要是β-折叠的二级结构. Cu_A 结构域蛋白的 CD 谱与嗜热菌(*Thermus thermophilus*)菌细胞色素 ba₃的水溶性重组体 Cu_A 结构域蛋白的 CD 谱相类似^[10]. Cu_A 结构域蛋白的 CD 谱结果与该蛋白的类似物 *Paracoccus denitrificans* 菌全酶晶体结构测定结果相一致^[11].

图 3 Cu_A 结构域蛋白的远紫外圆二色散谱
缓冲溶液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 蛋白浓度为 16 μmol/L

图 4 是 Cu_A 结构域蛋白在 Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液中的荧光光谱, 图 4(a)为激发谱, 图 4(b)为发射谱. 激发谱最大波长为 280 nm, 在 258, 270 和 288 nm 处有肩峰. 激发谱对应于它的吸收光谱, 这些谱带是由 Cu_A 结构域蛋白中的苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)的残基产生的, 258 nm 谱带主要是 Phe 产生的, 其他谱带主要是 Tyr 和 Trp 产生的. 在 280 nm 以上激发时可以消除 Phe 的荧光, 此时蛋白质的荧光发射主要表现为 Trp 发光, 这是由于蛋白质分子中 Tyr 到 Trp 的能量转移和附近肽链残基的猝灭所造成的. Trp 对它所处的微环境的极性很敏感, 在不同的蛋白质中其最大发射波长不一样. Cu_A 结构域蛋白含有 5 个 Trp 和 8 个 Tyr 荧光基团, 发射谱的最大波长为 345 nm. 它的最大发射峰位说明, Trp 只有少部分暴露于蛋白

图 2 Cu_A 结构域蛋白的紫外-可见吸收光谱
缓冲溶液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 蛋白浓度为 50 μmol/L

图4 Cu_A结构域蛋白的荧光光谱

(a) 激发光谱, 最大波长 $\lambda_{\max} = 280\text{ nm}$; (b) 发射光谱, 最大波长 $\lambda_{\max} = 345\text{ nm}$.
缓冲溶液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 蛋白浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$

分子表面. 因为游离 Trp 的发射峰位在不同的 pH 下, 在 351~361 nm 范围内^[11]. 这一结果与 *Paracoccus denitrificans* 菌全酶晶体结构测定结果也一致^[1]. 关于 Cu_A 结构域蛋白的荧光光谱的研究尚未见报道. 对该金属蛋白的进一步表征, 以及结合蛋白质工程的定点突变技术, 利用 Trp 作为内源性荧光探针的结构研究工作正在进行中.

致谢 本工作为国家自然科学基金重大资助项目(批准号: 39990600).

参 考 文 献

- 1 Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, et al. Structure at 2.8 Å of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Nature, 1995, 376: 660~669
- 2 Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, et al. The whole structure of the 13-subunit oxidised cytochrome c oxidase at 2.8 Å. Science, 1996, 272: 1136~1144
- 3 Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, et al. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. Science, 1998, 280: 1723~1729
- 4 Davis R E, Miller S, Hermsstadt C, et al. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4526~4531
- 5 Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nature Genetics, 1998, 20: 291~293
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Clone: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Lappalainen P, Aasa R, Malmstrom B G, et al. Soluble Cu_A-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome c oxidase. J Biol Chem, 1993, 268: 26416~26421
- 8 Farrar J A, Thomson A J, Cheesman M R, et al. A model of the copper centres in nitrous oxide reductase (*pseudomonas stutzeri*): evidence from optical, EPR and MCD spectroscopy. FEBS Lett, 1991, 294: 11~15
- 9 Farrar J A, Neese F, Lappalainen P, et al. The electronic structure of Cu_A: a novel mixed-valence dinuclear copper electron-transfer center. J Am Chem Soc, 1996, 118: 11501~11514
- 10 Slutter C E, Sanders D, Wittung P, et al. Water-soluble, recombinant Cu_A-domain of the cytochrome ba3 subunit II from *Thermus thermophilus*. Biochemistry, 1996, 35: 3387~3395
- 11 Melo E P, Costa S M B, Cabral J M S. Denaturation of a recombinant cutinase from *Fuearium solani* in AOT-iso-octane reverse micelles: a steady-state fluorescence study. Photochem Photobiol, 1996, 63: 169~175

(2001-01-08 收稿, 2001-04-16 收修改稿)