

疣荔枝螺微粒体细胞色素 P450 酶系的光谱分析

韩雅莉¹, 邓瑞鹏², 周小鹏²

1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510090

2. 汕头大学生物系, 广东 汕头 515063

摘要 从疣荔枝螺内脏团制备得到微粒体, 用 UV mini 1240 分光光度计对细胞色素 P450 酶系的三种主要成分: 细胞色素 P450、细胞色素 b_5 , NADPH 细胞色素 P450 还原酶进行了测定, 并对微粒体酶液进行 SDS-PAGE 电泳测试, 证明了疣荔枝螺体内含有细胞色素 P450 酶系的三种酶。

主题词 疣荔枝螺; 微粒体; 细胞色素 P450 酶系

中图分类号: Q559.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2006)01-0130-04

引言

有机锡 (Organotin) 是至少含有一个 Sn—C 共价键的金属有机化合物, 由于其对水生生物有显著的杀生作用, 近 20 年来作为新型防污涂料被广泛用于船坞保护业, 由此对海洋环境造成了严重污染, 这类物质已成为人为引入海洋环境中毒性最大的物质之一, 现已发现多种底栖软体动物由此而产生了不同程度的畸变现象^[1-4]。国外学者推测有机锡对生物体最重要的代谢酶系 (EC 1.14.14.1)——细胞微粒体混合功能氧化酶系产生了抑制作用, 该酶系主要包括细胞色素 P450, NADPH 细胞色素还原酶和细胞色素 b_5 还原酶, 其典型反应为 $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$, 即通过电子传递系统将分子氧化还原, 并将其中一个氧原子加到底物中, 反应需要 NADPH^[5]。

疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 属软体动物门, 其味鲜美是我国沿海居民广为食用的贝类之一, 喜栖于沿海浅滩及港湾水域中, 而这里恰为有机锡污染严重之处, 大量研究发现疣荔枝螺的性畸变程度与有机锡污染成正相关性^[6, 7], 因此将该螺作为监测有机锡污染的指示物种。本文分别从疣荔枝螺内脏团分离得到微粒体, 对 P450 酶系的 3 个主要组分^[5] 细胞色素 P450, 细胞色素 b_5 和 NADPH 细胞色素 P450 还原酶进行光谱分析, 并通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测螺体内该酶系的存在情况, 为了解软体动物 P450 的存在情况和进一步探讨 P450 酶系在该类动物体中所起的作用提供参考依据。

1 实验

1.1 仪器和试剂

Beckman J2 21M 高速冷冻离心机; Optima LE 80K 超速离

心机 (Beckman); Shimadzu UV Visible Spectrophotometer UV mini 1240 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); DYY-III 稳压稳流电泳仪和 DYY-III28 垂直夹芯电泳槽 (北京六一仪器厂) 等。标志蛋白 (上海生化研究所), 苯硫尿 PTU (北京试剂厂), 连二亚硫酸钠 (分析纯, 上海化学试剂厂), 1,4-二硫代苏糖醇 DTT (BBI 分装), 苯甲基磺酰氟 PMSF (BBI 分装), 考马斯亮兰 R 250 (Fluka 进口分装), 辅酶 II (NADPH) (上海生化研究所), 牛血清白蛋白 BSA (Fluka 进口分装), 细胞色素 C (北京试剂厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 微粒体的制备

疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 分别采自汕头市北山湾和南澳岛海区。平均体重 6.5 g, 活体运回实验室, 暂养于水箱。每次制备酶液用成年雌、雄螺各 25 只。

分别取新鲜雌、雄螺内脏团 7~10.5 g (每个内脏团平均重 350 mg), 剪成小块置小烧杯内, 按 1:2 (v/v) 加入匀浆液 (0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液 pH 7.5, 含 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.1 mmol·L⁻¹ DTT, 1 mmol·L⁻¹ PTU, 1 mmol·L⁻¹ PMSF 和 10% 甘油)^[8], 用内切式组织匀浆机制成匀浆, 匀浆液在 10 kg 离心 20 min, 上清液经 4 层纱布过滤, 再经 100 kg 超速离心 1 h, 弃上清液, 得微粒体沉淀, 将其悬浮于上述匀浆液置 -80℃ 冰箱储存备用。以上操作均在 4℃ 下完成。

1.2.2 细胞色素 P450 含量测定

参照文献^[9]的方法并加以改进。将稀释至 1 mg·mL⁻¹ 的微粒体悬浮液倒入 10 mL 小试管中, 加入 5 mg 连二亚硫酸钠, 混匀后等分到参比杯和样品杯中。参比杯作空白, 在紫外分光光度计 (UV mini 1240) 扫描基线, 然后在样品杯中通入 CO 1 min, 在波长 400~500 nm 范围扫描, 得到还原型细胞

收稿日期: 2004-06-16, 修订日期: 2004-09-28

基金项目: 国家自然科学基金 (30271033) 资助项目

作者简介: 韩雅莉, 1957 年生, 广东工业大学轻工化工学院教授

色素 P450 CO 复合物吸收光谱图, 记录 CO 差光谱, 以 $\Delta OD_{420-450} = 91$ 为毫摩尔消光系数及酶液的蛋白浓度计算细胞色素 P450 的含量。

1.2.3 细胞色素 b_5 含量测定

参照文献[9, 10]的方法并加以改进。将稀释至 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的微粒体悬浮液倒入 10 mL 小试管中, 然后等分到参比杯和样品杯中, 先将参比杯在紫外-分光光度仪上扫描基线, 然后在样品杯中加入 5 mg 连二亚硫酸钠, 混匀, 在波长 400 ~ 500 nm 范围扫描, 记录吸收值。以 $\Delta OD_{436-469} = 185$ 为毫摩尔消光系数及酶液的蛋白浓度计算 b_5 含量。

1.2.4 细胞色素 P450 还原酶活性测定

参考文献[11]的方法并加以改进。取 $1.5\text{ mL } 0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.8 的磷酸钠缓冲液, 加入 $50\text{ }\mu\text{L } 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞色素 C, 0.5 mL 微粒体粗酶液和 $50\text{ }\mu\text{L } 1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NADPH, 连续 3 min 用紫外-分光光度仪测定在 550 nm 光吸收 (OD_{550}) 值, 以毫摩尔消光系数 21.1 及酶液的蛋白浓度计算细胞色素 C 被还原的量。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质含量

采用垂直板电泳, 4% 浓缩胶, 12% 的分离胶, 恒流 20 mA, 上样量为 $100\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白, 采用考马斯亮蓝染色法, 以牛血清白蛋白为分子量参照物。

2 结果与讨论

2.1 疣荔枝螺微粒体蛋白 SDS PAGE 电泳鉴定

细胞色素 P450 酶系是存在于微粒体中分子量 40~ 60 kDa 范围内的一类蛋白质^[10]。本试验对疣荔枝螺内脏团匀浆后高速离心得到微粒体, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮蓝染色, 显出分子量在 40~ 60 kDa 范围内的条带 3 条 (见图 1, 箭头所示)。目前从不同生物获得的该酶同工酶组分有所差异, 如从大白鼠肝微粒体中至少鉴定出 6 种组分, 从抗性品系家蝇微粒体中分离出 4 种组分, 组分的差异可能

与物种进化程度有一定关系。

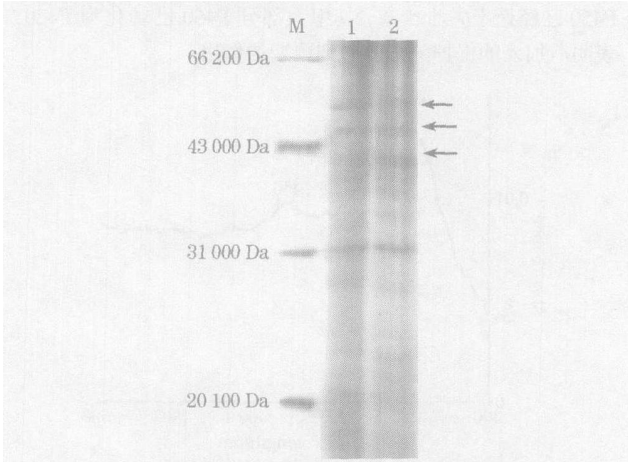


Fig 1 SDS PAGE patterns of *T. clavigeras*
M standard protein(Marker);
1, female; 2, male

2.2 疣荔枝螺 P450 酶系 3 种主要组分测定

分别在波长 400~ 500 和 550 nm 下对雌、雄疣荔枝螺 P450 酶系 3 种主要组分进行扫描, 由表 1 可以看出雌、雄疣荔枝螺内脏团微粒体细胞色素 P450 和细胞色素 b_5 还原酶含量以及 NADPH 细胞色素还原酶活性存在一定差异, 其中两性样品的细胞色素 b_5 还原酶差异不显著, 而细胞色素 P450 雌螺的含量约为雄性的 2 倍, 雄性 NADPH 细胞色素还原酶活性约为雌性的 1.7 倍。细胞色素 P450 酶系是动物体内类固醇激素生物合成过程中的限速酶, 类固醇激素的合成转化途径为胆固醇先转化为雄烯二酮, 后者再转化为睾酮和雌酮, 其中细胞色素 P450 可以催化雄烯二酮转化为睾酮和雌酮(或 17β -雌二醇), 因而细胞色素 P450 酶系中各组分和活性的差异, 在一定程度上表明了雌雄性别之间的差异, 即在转化类固醇激素为雄激素或雌激素方面有所差异。

Table 1 The components of P450 from of female and male *T. clavigeras*

<i>T. clavigeras</i>	Cytochrome P450 ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$)	Cytochrome b_5 ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$)	NADPH-Cytochrome P450 reductase activity ($\text{nmol cytochrome C reduced}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}\cdot\text{min}^{-1}$)
Female	21.7 ± 11.0	49.0 ± 13.0	0.490 ± 0.163
Male	39.1 ± 15.0	49.1 ± 12.0	0.286 ± 0.100

Data are Mean $\pm$ Standard deviation of three or four replicates

2.3 细胞色素 P450 紫外-可见吸收光谱

本试验中将疣荔枝螺内脏团微粒体酶液用二亚硫酸钠还原后通 CO, 在 400~ 550 nm 范围扫描, 分别在 420 和 450 nm 处各得到一 CO 差光谱特异吸收峰(见图 2), 表明酶液中除 P450 外还有细胞色素 P420 存在, 而且 P420 含量远远大于 P450, 两者之比约达 5:1。P450 酶系为多酶复合体, 它们由一组以 Fe 卟啉为活性位置的血红素单链蛋白质组成, 能够使氧通过催化作用加合于底物, 其还原态与 CO 结合后生成的配合物(见图 3 中 d)在波长 450 nm 处有特异吸收峰, 其在生物体内所参与的循环如图 3。在生物多功能氧化酶反应中 P450 起末端氧化酶的作用, 它不仅负责与氧分子结合活化

氧, 而且有底物结合位点, 故决定酶的专一性; 还原型 P450 可与 CO 竞争性结合而成为六配体, 活性降低, 其最大吸收由 420 nm 转入 450 nm。P420 是细胞色素 P450 的前体形式。由于在微粒体膜上有磷脂组分, 内含有未饱和脂肪酸, 空气能将其氧化为脂过氧化物, 在此过氧化物作用中 P450 易被分解为 P420, 在增溶处理时也诱导其变为 P420, 此外在制备和测定过程中 O_2 、高温或增溶剂等都会使 P450 酶转化为 P420, 因而 P420 就是失活状态的 P450。事实上, 作者考虑到上述因素对 P450 酶系的不利影响, 在本实验的缓冲溶液中加入几种试剂来防止 P450 的变化, 如 PMSF 为蛋白酶抑制剂, DTT 和 PTU 为二硫键保护剂, EDTA 能螯合干扰离子, 甘油能保

护 P450, 试验结果表明试验中部分 P450 已经处于失活状态, 其中大部分 P450 已转化为 P420, 表明所加入的保护剂未能起到预期的作用。

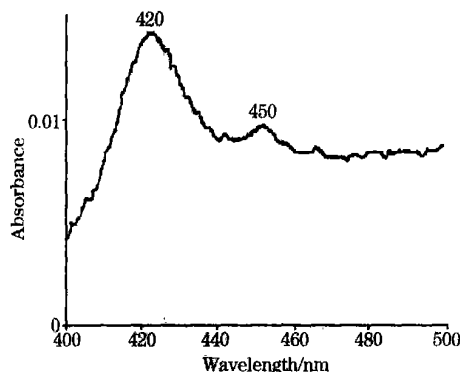


Fig. 2 Difference spectrum of *T. davigeras* microsomal cytochrome P450 reduced by carbon

2.4 细胞色素 b₅ 的紫外-可见吸收光谱

细胞色素 b₅ 是亲水脂蛋白, 由两种蛋白组成, 一为与生物膜相互作用的疏水性蛋白, 另一为含氧化还原活性的血红素分子的亲水性蛋白, 这两种蛋白以 15 个氨基酸残基相连^[5]。氧化型的血红素蛋白最大波长为 413 nm, 还原型细胞色素的波长为 423, 526 和 557 nm^[12]。图 4 可以看出本试验疣荔枝螺微粒体细胞色素 b₅ 在 426 nm 左右有一最大吸收峰。在一定的实验条件下, 加入适量连二亚硫酸钠可以诱导细胞色素 b₅ 的血红素中心核还原, 但对卟啉基团影响不大, 仍在氧化态, 这种变化在差光谱上表现为 426 nm 左右的

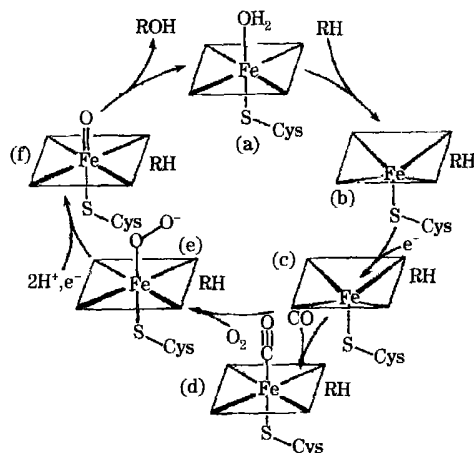


Fig. 3 Reaction cycle of cytochrome P450

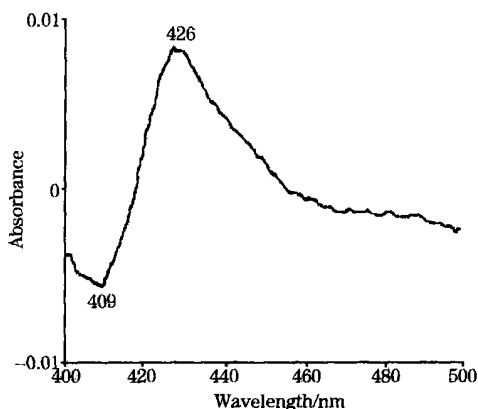


Fig. 4 Different spectrum of *T. davigeras* microsomal cytochrome b₅

参 考 文 献

- [1] ZHOU Ming jiang, LI Zheng yan, YAN Tian(周名江, 李正炎, 颜 天). Advances in Environmental Science(环境科学进展), 1994, 2(4): 67.
- [2] SHI Hua hong, HUANG Chang jiang, XIE Wei yong(施华宏, 黄长江, 谢文勇). Marine Environmental Science(海洋环境科学), 2002, 21(4): 37.
- [3] SHI Hua hong, HUANG Chang jiang(施华宏, 黄长江). Acta Ecologica Sinica(生态学报), 2001, 21(10): 1711.
- [4] HAN Ya li, ZHOU Xiao peng, LI Xing nuan(韩雅莉, 周小鹏, 李兴暖). Journal of Shanghai Fisheries University(上海水产大学学报), 2003, 12(2): 174.
- [5] LENG Xir fu, QIU Xing hui(冷欣夫, 邱星辉). Structure, Function and Perspect of Cytochrome P450(细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2001. 1.
- [6] Spooner N, Gibbs P E, Bryan G W. Mar. Environ. Res., 1991, 32: 37.
- [7] Bettin C, Oehlmann J, Stroben E, et al. Helgol Meeresunters, 1996, 50: 299.
- [8] SHEN Jun, XU Pei pei, JIN Xi peng(沈 钧, 徐佩佩, 金锡鹏). Industrial Hygiene and Occupational Disease(工业卫生与职业病), 1997, 23(4): 236.
- [9] Tsuneo Omura, Ryo Sato. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(7): 2370.
- [10] QIU Xing hui, LI Wei, LENG Xir fu(邱星辉, 李 薇, 冷欣夫). Acta Zoologica Sinica(动物学报), 2002, 48(2): 208.
- [11] Jorge C, Antonio M, Albert S P, Moises Agosin. Biochemistry, 1973, 12(7): 1445.
- [12] LI Ren qiang, CHEN Yao, JIANG Feng yi(李任强, 陈 瑶, 江凤仪). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 58.

Spectral Analysis and Study of the Microsome Cytochrome P450 Aromatase of *Thais clavigera*

HAN Ya li¹, DENG Rui peng², ZHOU Xiao peng²

1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China

2. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract The microsomes were prepared from the viscera masses of *Thais clavigeras*. It is well known that there are some main components in microsome cytochrome P450 aromatase, including cytochrome P450, cytochrome b₅ and NADPH cytochrome P450 reductase. So the contents of cytochrome P450 and cytochrome b₅, and the activity of NADPH cytochrome P450 reductase were determined by Shimadzu UV Visible spectrophotometer. And the microsomal proteins were analysed by SDS PAGE. All the results indicated that there exists P450 arom in the *T. clavigeras*.

Keywords *Thais clavigera*; Microsome; Cytochrome P450 aromatase

(Received Jun. 16, 2004; accepted Sep. 28, 2004)

第十四届全国分子光谱学学术会议(第一论通知)

会议简介

“第十四届全国分子光谱学学术会议”由中国化学学会物理化学委员会和中国光学会光谱委员会联合主办、吉林大学超分子结构与材料教育部重点实验室承办,定于 2006 年 7 月 8 ~ 11 日在长春召开。届时,会议将就分子光谱基础研究和应用技术等进行广泛的学术交流,同时将邀请国内外知名学者对有关学术领域的热点问题做报告,会议将组织各类专题讨论和学术交流。

本次会议是我国分子光谱界的又一次聚会和高水平、高信息容量的学术交流。竭诚欢迎全国高等院校、科研机构和产业部门从事分子光谱研究和应用开发的同事和朋友们来吉林大学参加会议,交流最新研究成果,推进分子光谱基础研究和应用在国民经济和高新技术开发中的广泛应用和技术转化。我们真诚期待着国内外同行在 2006 年 7 月相聚在美丽的北方城市——长春。

征文范围

分子光谱理论研究、激光光谱测量、红外、拉曼、振动、紫外、可见、发射、吸收、X 射线荧光光谱等在冶金、地质、机械、环保、国防、医药、农林、化工、商检及其他各领域的最新研究成果、学科发展前沿和进展。论文内容未在期刊杂志上发表过或其他全国或国际会议宣读过。具体涵盖下述各方面:

1. 理论研究(振动分析,分子动力学/量子化学计算和结构,光谱线型和强度)
2. 超快现象、时间分辨、非线性效应
3. 二维相关光谱
4. 近红外光谱
5. 表面等离子共振(SPR)技术
6. 表面增强光谱(红外、拉曼、荧光光谱)
7. 红外光谱、拉曼光谱、荧光光谱、磷光光谱、紫外-可见吸收光谱、激光光谱、光谱成像技术等催化及表面/界面科学、分析化学、生物科学、医学、药学、新材料、矿物、地学、工业过程、环境和其他领域的应用。

征文要求

提交论文扩展摘要一份,纸张大小用 A4 纸版式(用 Office word 软件排版,页边距为 2 cm,单倍行距)。扩展摘要按以下顺序排版:文题(三号黑体居中);作者(四号仿宋居中);单位(小四号宋体居中,含所在省市、邮政编码、电子邮址(如有));论文的创新性、研究意义与结果(五号宋体);主题词和主要参考文献(自版芯左起,五号宋体)。文稿中可穿插主要论据的图、表和照片,图题、图注和表题、表注一律用英文表述。具体投稿要求可参看模板及《光谱学与光谱分析》征稿简则。届时请您登陆我们的网站,将您要提交的论文通过网页上传给我们。也可以通过信件方式投稿。稿件一经录用,将由《光谱学与光谱分析》以增刊形式全文发表。

(下转第 136 页)