

## 光诱导细胞色素 b<sub>5</sub> 还原反应及机理的光谱学研究

唐 乾<sup>1,3</sup>, 黄 婷<sup>2,3</sup>, 官婷婷<sup>1,3</sup>, 曹洪玉<sup>1,3</sup>, 王爱玲<sup>2,3</sup>, 王立皓<sup>2,3</sup>, 郑学仿<sup>1,2,3\*</sup>

1. 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622
2. 大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622
3. 辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连大学, 辽宁 大连 116622

**摘 要** 在生命体内有关电子转移的研究备受关注, 其中蛋白质以及酶之间的电子转移研究已成为热点, 目前有关光诱导血红素蛋白还原的详细机理尚不明确, 电子转移也许是解释这一机理的有效途径。通过紫外-可见吸收光谱、稳态荧光光谱和圆二色等光谱系统地研究了体外近生理溶液环境中, 不同的紫外定波长、pH、游离氨基酸、谷胱甘肽、咪唑对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原的影响, 以阐明 Cyt b<sub>5</sub> 不能用传统提出的机制去解释的光还原机制。结果表明: 在近紫外区通过直接的光激发高铁细胞色素 b<sub>5</sub> (Cyt b<sub>5</sub>) 可以使其被还原成亚铁 Cyt b<sub>5</sub>, 经过分析发现了 Cyt b<sub>5</sub> 被光还原的机制和促进条件。用 280 nm 单色光照射 Cyt b<sub>5</sub> 溶液, 发现随着光照时间的延长, Cyt b<sub>5</sub> 溶液紫外-可见光谱中 Soret 带由 412 nm 红移到 421 nm, Q 带 556 nm 处吸收峰逐渐增强。Cyt b<sub>5</sub> 被光照后发生了类似化学还原剂作用的还原反应, 同时发现了不同的光照波长、不同的 pH、氨基酸种类以及各种其他配体等存在下对 Cyt b<sub>5</sub> 的还原程度影响不同。采用 280 nm 波长、在偏碱性条件下光照 Cyt b<sub>5</sub> 时还原程度最强; 溶液中加入谷胱甘肽和咪唑能通过提供电子和氢供体途径促进 Cyt b<sub>5</sub> 的光照还原反应发生; 溶液中游离 Met 的存在能以最大速率促进光照还原反应的发生。基于以上结果提出 Cyt b<sub>5</sub> 光还原的机理是从卟啉环到三价铁的电子转移, 通过 280 nm 激发形成卟啉  $\pi$  阳离子基团和亚铁。采用稳态荧光光谱和圆二色谱对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原发生前后进行检测, 发现光诱导蛋白发生还原后, Cyt b<sub>5</sub> 主链结构逐渐伸展, 二级结构发生了一定改变,  $\alpha$ -螺旋含量逐渐降低,  $\beta$ -折叠含量逐渐升高, 但是整个 Cyt b<sub>5</sub> 的二级结构仍以  $\alpha$ -螺旋为主。该研究结果不仅对了解光对含血红素蛋白(酶)的结构和功能的影响有重要的理论和实践意义, 而且对于生命体内的氧化还原反应和电子传递机制提供一定理论依据。

**关键词** 细胞色素 b<sub>5</sub>; 光诱导; 氧化还原; 光谱

**中图分类号:** O657.32 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)03-0821-07

## 引 言

电子的有效和受控运动是生物学的主要调控机制之一, 对生物体的存在至关重要<sup>[1]</sup>。电子转移反应(electron transfer, ET)在生物系统功能中起着关键的作用<sup>[2-4]</sup>。例如, 在光合作用中心, 光子激发和随后的电荷转移是生命过程的驱动力。

细胞色素 b<sub>5</sub> (Cytochrome b<sub>5</sub>, Cyt b<sub>5</sub>) 是一种与膜结合约 18.6 KD 的低分子蛋白, 由约 133 个氨基酸残基组成, 主要在高等动物肝细胞内质网膜中富集, 其功能主要是在电子传递中传递电子, 例如, Cyt b<sub>5</sub> 可以接受来自 NADPH-细胞色

素 P450 还原酶<sup>[5-6]</sup>和 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶<sup>[7]</sup>的电子, 并且可以将它们转移到许多电子受体蛋白质, 两者都是氧化还原受体。如细胞色素 c 和天然受体<sup>[8]</sup>, 细胞色素 P450<sup>[9]</sup>, 血红蛋白<sup>[10]</sup>, 高铁肌红蛋白等。这种电子传递一直是广泛研究的课题, 但 Cyt b<sub>5</sub> 协助电子传递的具体机制尚未完全阐明。光还原似乎可以阐明蛋白质内的电子传递途径。许多学者通过光激发辐射样品测定其紫外-可见吸收光谱, 研究血红素蛋白和金属卟啉的光还原反应。国外文献报道大多集中在外源供体不存在的情况下, 血红素蛋白(如细胞色素 c 和细胞色素 P450)的光还原。周华伟等<sup>[11-12]</sup>发现光诱导 metMb 还原的机理为光诱导分子内电子转移, 光照还原程度因入射光波长而异, 低温、碱性有利于 metMb 的光照还原。Bartoc-

收稿日期: 2021-02-01, 修订日期: 2021-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(21571025, 21601024, 21601025, 21601023), 大连大学科研平台重点项目(2021012D01)资助

作者简介: 唐 乾, 女, 1978 年生, 大连大学生命科学与技术学院副教授 e-mail: tangqian@dlu.edu.cn

\* 通讯作者 e-mail: dlxfzheng@126.com

ci 等声称血红素轴向配体通过提供一个电子并将其转移到血红素铁中,使铁原子还原。但 Ozaki 等观察到铁配体电荷转移带的光激发不诱导光还原。有研究认为,芳香族氨基酸,特别是色氨酸,是有助于电子的转移<sup>[13]</sup>。有报道研究了 Cyt c 光还原的波长依赖性,在芳香族氨基酸吸收的光子能量范围内测定固定波长 254 nm 的光还原效率。然而,从该数据中并未得出光还原效率的波长依赖性是否遵循 Cyt c 中色氨酸和酪氨酸的光学吸收。共振拉曼光谱同样可用于研究血红素蛋白质光还原,但血红素光还原的详细机制仍然是难以捉摸的。

Cyt b<sub>5</sub> 的代谢功能和结构特性已经被广泛研究,但是关于这种细胞色素改变氧化态的机制的实验信息却很少。因此本实验运用紫外-可见吸收、荧光和圆二色光谱法系统地研究了溶液中不同的紫外定波长、pH、氨基酸、谷胱甘肽对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原的影响,以阐明 Cyt b<sub>5</sub> 还不能用传统提出的机制去解释的光还原机制。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

试剂:含牛肝微粒体细胞色素 b<sub>5</sub> 水溶性片段基因质粒由美国西北大学 Hoffman 教授惠赠;蛋清溶菌酶和 Ampicillin(购于 Sigma 公司);BL21-DE3 感受态细胞(购于宝生物有限公司);酵母提取物和蛋白胨(购于 OXOID 公司);DEAE Sepharose™ CL 6B(购于 GE 公司)、Sephadex™ G-100(购于 Amersham 公司)、其他试剂均为分析纯;实验用水为超纯水。

仪器:V-560 紫外-可见分光光度计(日本 Jasco 公司);RF-6000 荧光分光光度计(日本岛津公司);J-810 型圆二色谱仪(日本 Jasco 公司)。

### 1.2 方法

(1)细胞色素 b<sub>5</sub> 蛋白溶液的获得<sup>[14]</sup>。

转化(将含 Cyt b<sub>5</sub> 外源基因质粒通过热击转化至大肠杆菌 BL21-DE3 感受态细胞中)→筛选阳性克隆(选取在含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 固体培养基上生长的红色菌落)→菌体培养和收集(含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基培养 20~24 h 后,4 ℃、5 000 r·min<sup>-1</sup>、10 min 离心收集菌体备用)→蛋白获取(菌体经溶菌酶和超声裂解、透析、DEAE-CL-6B 和 Sephadex G-75 柱层析、最后收集、浓缩)→纯度鉴定,最终得到纯度在 96% 以上的 Cyt b<sub>5</sub> 蛋白浓缩液→-196 ℃液氮保存。Cyt b<sub>5</sub> 浓度测定:根据摩尔消光系数  $\epsilon_{412} = 117 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <sup>[14]</sup>,采用朗博-比尔定律进行定量分析。

(2)UV-Vis 吸收光谱

Cyt b<sub>5</sub> 溶解于 pH 7.4, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 PB 缓冲液进行测定。还原态 Cyt b<sub>5</sub> 溶液为加入 0.25 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 获得。扫描波长:220~700 nm,扫描速率:200 nm·min<sup>-1</sup>,取三次实验平均结果等。

(3)荧光光谱测定

Cyt b<sub>5</sub> 溶解于 pH 7.4, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 PB 缓冲液进行测定。扫描波长范围:290~450 nm,扫描速率:200 nm·

min<sup>-1</sup>,累计三次取平均结果。

(4)圆二色谱(CD)

Cyt b<sub>5</sub> 溶解于 pH 7.4, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 PB 缓冲液进行测定。扫描范围:190~250 nm,光径:1 mm,扫描速度:50 nm·min<sup>-1</sup>,取 3 次平均结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Cyt b<sub>5</sub> 的 UV-Vis 吸收光谱

Cyt b<sub>5</sub> 蛋白电子传递功能的完成通过其活性中心的血红素中心铁的价态变化来实现,实验结果见图 1。Cyt b<sub>5</sub>-Fe<sup>III</sup> 的特征吸收峰波长为 412, 532 和 560 nm,还原态的 Cyt b<sub>5</sub>-Fe<sup>II</sup> 的特征吸收峰波长 423, 527 和 556 nm。实验前对 Cyt b<sub>5</sub> 进行 UV-Vis 光谱表征(图 1),可知样品 Cyt b<sub>5</sub> 主要以氧化态形式存在。光谱显示了 350~700 nm 范围内的三个吸收带,412, 560 和 532 nm。随后用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 还原,产生红线所示的吸收光谱。还原形式的 Soret 带红移 11 nm, Q 波段峰强度增加峰位置发生移动,在 527 和 556 nm 处形成两个吸收峰,说明以氧化态形式存在的 Cyt b<sub>5</sub> 被还原。

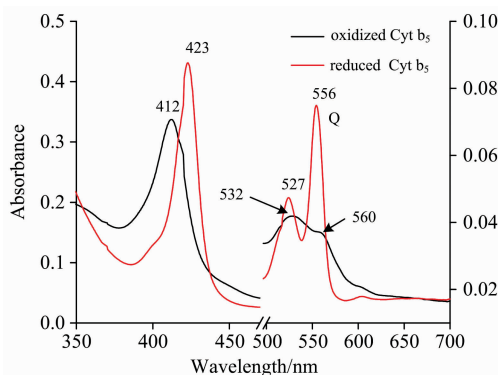


图 1 细胞色素 b<sub>5</sub> 的紫外-可见吸收光谱

Fig. 1 Stationary absorption spectra of completely oxidized (black) and completely reduced (red) Cyt b<sub>5</sub>

### 2.2 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原与化学还原的 UV-Vis 吸收光谱比较

图 2(a)和(b)为氙灯分出的 280 nm 单色光照射 Cyt b<sub>5</sub> 溶液的紫外-可见吸收光谱。随着光照时间延长, Cyt b<sub>5</sub> 的 Soret 带 412 nm 处吸收峰强度逐渐降低并红移到 421 nm 处,其 Q 带 532 和 560 nm 处吸收峰强度降低,最终在 527 和 556 nm 形成新吸收峰,同时在 416 和 546 nm 附近出现两个等吸收点。与图 3 中的结果比较可发现 Cyt b<sub>5</sub> 在 280 nm 氙灯光照后吸收光谱图与化学还原后的谱图变化趋势一致。向 Cyt b<sub>5</sub> 样品中加入不同浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 溶液,充分反应 2 min 后 UV-Vis 光谱表明, Cyt b<sub>5</sub> 样品 412 nm 处的特征吸收峰强度随着 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 溶液浓度的增加而逐渐降低并红移至 423 nm [图 3(a)],其 Q 带 532 和 560 nm 处的特征吸收峰逐渐增强 [图 3(b)]。当加入过量 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 时,其 Q 带 527 和 556 nm 吸收峰不断增强,最终在 416 和 546 nm 附近出现两个等吸收点。UV-Vis 光谱表明在室温条件下光照 Cyt b<sub>5</sub> 可产生与上述化学还原过程类似现象。光照还原 Soret 带峰位置未达最

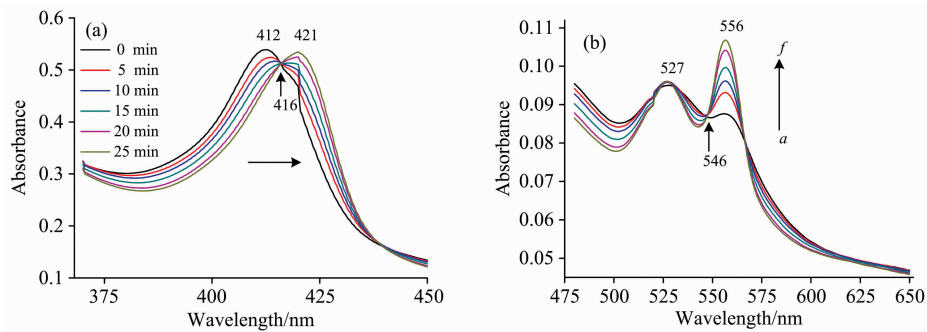


图 2 Cyt b<sub>5</sub> 光照前后的 UV-Vis 吸收光谱图

(a): 光照前; (b): 光照后

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of Cyt b<sub>5</sub> with/without irradiation at 280 nm

(a): Before illumination; (b): Upon illumination

$$c_{\text{Cyt } b_5} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

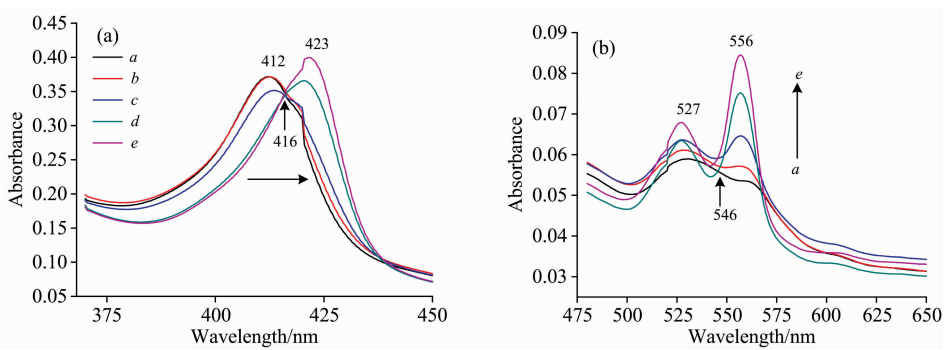


图 3 Cyt b<sub>5</sub> 化学还原的 UV-Vis 吸收光谱

(a): 含有连二亚硫酸钠的 Q 带吸收峰; (b): 连二亚硫酸钠浓度从 a→e 的光谱

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of chemical reduction for Cyt b<sub>5</sub> with sodium dithionite

(a): The absorption spectra of chemical reduction for Cyt b<sub>5</sub> in Soret band with sodium dithionite;

(b): The absorption spectra of chemical reduction for Cyt b<sub>5</sub> in Q band with sodium dithionite

$$c_{\text{Cyt } b_5} = 3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ from a to e, } c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4} = 0, 3, 6, 9, 12 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ respectively}$$

终还原态 423 nm, 归因于少量的蛋白质发生变性。即使在光还原 Cyt b<sub>5</sub> 中加入还原剂 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 其峰强度仍然比直接化学还原 Cyt b<sub>5</sub> 的还原峰强度要小(数据未列出)。

### 2.3 不同定波长对 Cyt b<sub>5</sub> 光还原的影响

爱因斯坦光子理论阐述: 光能量与波长呈反比; 而物质结构不同, 会吸收不同波长的光。为了探究波长对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原的影响, 实验选用氙灯分出的不同定波长(254, 280, 412 和 423 nm)照射 Cyt b<sub>5</sub> 溶液 25 min。经不同波长光照射后, Cyt b<sub>5</sub> 的 Soret 带 412 nm 处特征吸收峰强度均降低并红移, 其 Q 带 527 和 556 nm 处的特征吸收峰有明显增强。在不同的波长光照射下, 随着光照时间延长 527 和 556 nm 处吸收峰强度发生变化, 但变化的趋势不同。其中 280 nm 光照射时 527 和 556 nm 吸收峰强度增加的趋势最大, 即还原产物 Cyt b<sub>5</sub>-Fe<sup>II</sup> 最多。图 4(a-d) 分别为四种波长光照射 Cyt b<sub>5</sub> 对还原影响程度, 280 nm > 254 nm, 412 和 423 nm 对光照还原没有影响。由此说明 Cyt b<sub>5</sub> 被紫外光诱导还原, 还原程度并非与光照射能量成正比。Cyt b<sub>5</sub> 分子中有 1 个 Trp、4 个 Tyr 和 3 个 Phe 残基。280 nm 光照引起的还原反

应现象最明显的原因是 280 nm 波长光易被 Trp 吸收。光子被 Trp 大量吸收形成激发态, Trp 通过激发能量传递至铁卟啉基团激发态, 进而引发光氧化过程。280 nm 光能被大量吸收, 能量比较高, 因此比 254 nm 更有利于光照氧化。分析认为, 412、423 nm 不是芳香族氨基酸的特征吸收峰, 能量比较低, 难以激发铁卟啉基团至激发态, 与 Consani 等<sup>[15]</sup>提及的 Trp 在肌红蛋白 Trp-to-Heme 能量传递过程中起重要作用的结论相吻合; 另一方面, 这些波长引发的还原速率非常慢, 氧气可能会泄露到样品中, 从而阻止蛋白质发生光还原。

### 2.4 pH 对 Cyt b<sub>5</sub> 光还原的影响

Cyt b<sub>5</sub> 蛋白在不同的 pH 缓冲溶液中显示不同的价态和构象。研究了 pH 为 5.4, 6.4, 7.4, 8.0 和 9.0 缓冲溶液中的光还原情况。在 pH 为 5.4 缓冲溶液中, 基线有明显的漂移现象, 为了分析数据的准确性, 采用峰面积对 pH 作图分析。如图 5(a,b) 所示分别在五个不同 pH 条件下, 280 nm 光照对 Cyt b<sub>5</sub> 光还原的影响。光照前, 560 nm 处吸收峰面积随着 pH 的升高而略微增加, 但 Soret 带的特征吸收峰位置仍

在 412 nm 处, 说明 Cyt  $b_5$  未发生还原反应; 光照 25 min 后, 随着 pH 由酸性到碱性的变化, Cyt  $b_5$  溶液的 Soret 带和 Q 带的吸收峰面积逐渐增加, 实验范围内, 即 pH 值越大越容易发生光还原反应。分析认为光还原过程中会产生部分  $H^+$ , 碱性条件下  $OH^-$  会中和部分  $H^+$ , 因此 Cyt  $b_5$  在偏碱性条件下易于发生光照还原。

## 2.5 谷胱甘肽对 Cyt $b_5$ 光照还原的影响

谷胱甘肽(GSH)在所有生物细胞中存在, 其还原性的巯基有很强的供电能力, 可参与体内重要的氧化还原反应。GSH 的巯基有微弱的还原性, 黑暗条件下不会直接与蛋白相互作用, 采用氙灯 280 nm 光激发卟啉后, GSH 开始参与

反应并对 Cyt  $b_5$  的还原反应起促进作用。光照作用明显提高了 GSH 的还原能力(见图 6)。GSH 巯基( $-SH$ )上的 S 原子带有孤电子对, 可以提供电子给  $Fe^{III}$ , 当 Cyt  $b_5$  被光照后形成激发态的高铁血红素辅基, 电子从卟啉环转移到中心铁原子上形成亚铁血红素辅基阳离子自由基, S 原子提供电子给亚铁血红素辅基, 促进了亚铁 Cyt  $b_5$  的形成。以上结果表明 GSH 和卟啉均非光照氧化还原过程中的氧化剂或者还原剂, 类似于叶绿素光反应过程, 它们都是电子传递的“中间人”, 整个反应是卟啉、GSH 和铁之间的能量和电子传递过程, 此链式超快电子转移过程是在溶液中光激发铁卟啉和 GSH 后进行的。

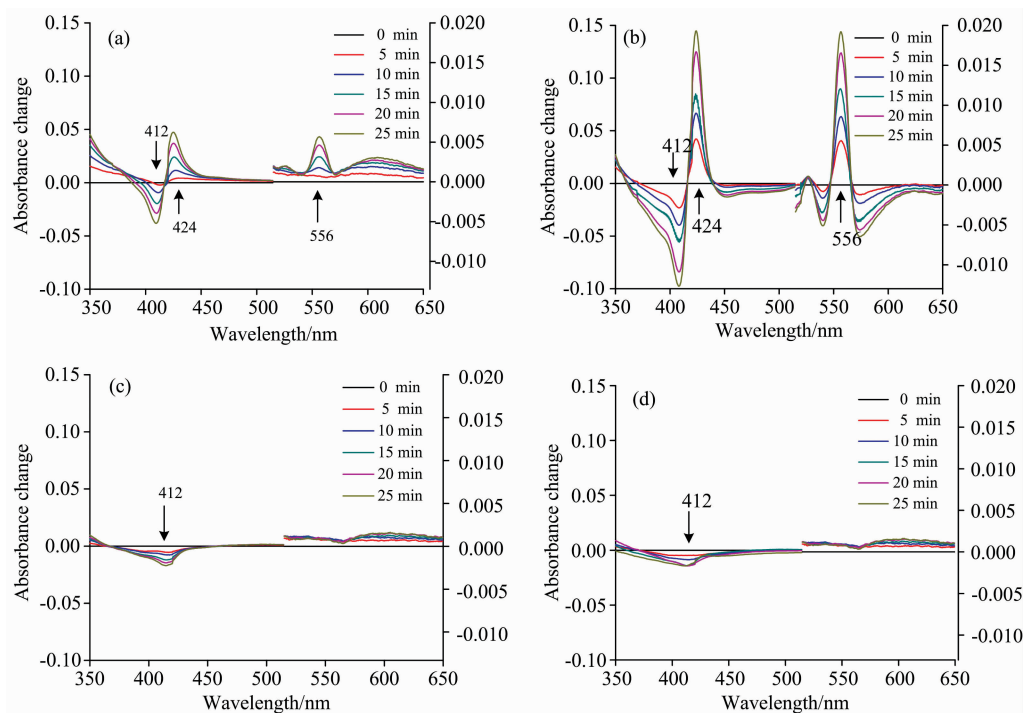


图 4 不同波长氙灯光照 Cyt  $b_5$  (pH 7.4) 25 min 后紫外-可见吸收变化光谱图

(a): 254 nm; (b): 280 nm; (c): 412 nm; (d): 423 nm

Fig. 4 UV-Vis absorbance change of Cyt  $b_5$  irradiated by xenon lamp at different fixed wavelengths

(a): 254 nm; (b): 280 nm; (c): 412 nm; (d): 423 nm

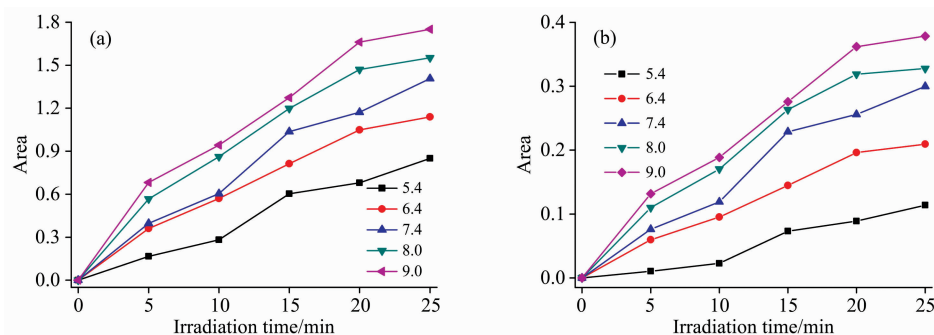


图 5 不同 pH 条件下 Cyt  $b_5$  溶液光还原峰面积的变化曲线

(a): 412 nm 处吸收峰曲线变化; (b): 556 nm 处吸收峰曲线变化

Fig. 5 Curve of irradiation reduction peak area of Cyt  $b_5$  solution under different pH conditions at 280 nm

(a): The peak area changes at 412 nm; (b): The peak area changes at 556 nm

### 2.6 甲硫氨酸对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原的影响

图 7 中从 Soret 和 Q 带峰强度和峰位置可以判断出, 未加入 Met 时其 Soret 带峰位置没有发生明显变化仍为 412 nm, 但是其峰强度有小幅度的下降, 其 Q 带在 566 nm 形成一个微弱的小峰; 加入 Met 时其 Soret 带峰位置发生明显改变由 412 nm 红移到 420 nm 处, 其 Q 带 566 nm 处形成一个非常明显的还原峰。通过比较可以确定 Met 对光照还原有非常好的促进作用。分析认为 Met 在 Cyt b<sub>5</sub> 被光照还原过程中产生的 ·OH 自由基产物被 Met 清除, 进而促进了光照还原速率的提升<sup>[16]</sup>。

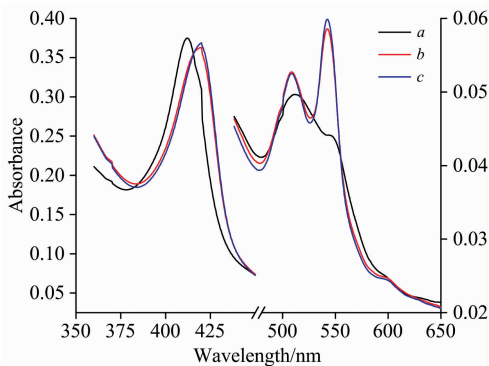


图 6 加入 GSH (pH 7.4) 25 min 后 Cyt b<sub>5</sub> 的紫外-可见光谱图

a: Cyt b<sub>5</sub> 未做处理; b: Cyt b<sub>5</sub> 光照 25 min;  
c: 加入 GSH 的 Cyt b<sub>5</sub> 光照 25 min

Fig. 6 UV-Vis absorbance change of Cyt b<sub>5</sub> added GSH under pH 7.4

a: Cyt b<sub>5</sub>; b: Cyt b<sub>5</sub> irradiated at 25 min;  
c: Cyt b<sub>5</sub>-GSH irradiated at 25 min

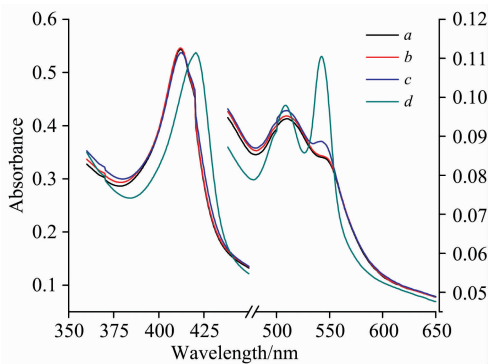


图 7 加入 Met (pH 7.4) 5 min 后 Cyt b<sub>5</sub> 的紫外-可见光谱图

a: Cyt b<sub>5</sub> 未做处理; b: 暗处理 30 min Cyt b<sub>5</sub>; c: 光照 5 min Cyt b<sub>5</sub>-GSH; d: 加入 Met 后 Cyt b<sub>5</sub> 光照 5 min

Fig. 7 UV-Vis absorbance change of Cyt b<sub>5</sub> added Met under pH 7.4

a: Cyt b<sub>5</sub>; b: in dark 30 min;  
c: Cyt b<sub>5</sub> irradiated at 5 min; d: Cyt b<sub>5</sub>-Met irradiated at 5 min

### 2.7 咪唑对 Cyt b<sub>5</sub> 光照还原的影响

取 2 μL 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 的咪唑溶液于 2 mL Cyt b<sub>5</sub> 蛋白溶液中黑暗中放置 30 min, 测其紫外-可见吸收光谱, 发现谱

图基本没有发生变化。图 8(a,b) 分别为 Cyt b<sub>5</sub> 在光照射前后其 412 和 566 nm 处峰面积的变化图, 由图 8 可知: 咪唑可以促进 Cyt b<sub>5</sub> 光还原反应的发生。咪唑加入 Cyt b<sub>5</sub> 蛋白溶液后, 可以作为光还原电子供体促进光照还原反应的进行。咪唑的五元杂环中含有两个间位的氮原子, 与组氨酸结构类似可结合血红素, 其 1-位氮原子的未共用电子对参与环状共轭, 导致氮原子的电子云密度有所下降, 从而 1-位氮原子上的氢易以 H<sup>+</sup> 形式离去。咪唑残基上的给电子基团对还原速率具有显著促进作用。

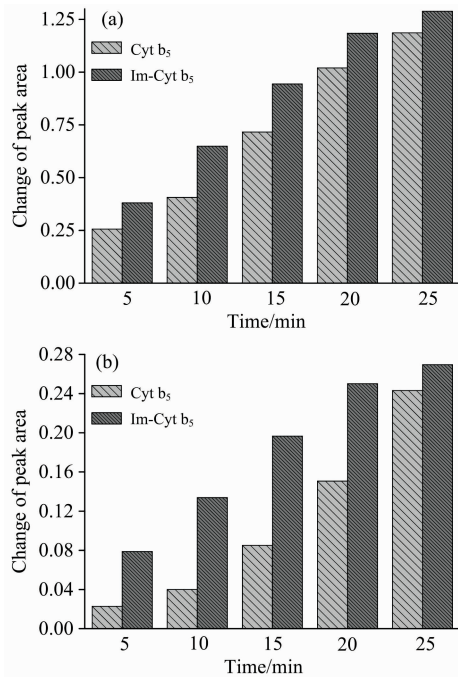


图 8 加入咪唑 (pH 7.4) 25 min 后 Cyt b<sub>5</sub> 的紫外-可见光谱图

(a): 420 nm 峰面积变化; (b): 556 nm 峰面积变化

Fig. 8 UV-Vis absorbance change of Cyt b<sub>5</sub> added imidazole under pH 7.4

(a): The peak area changes at 412 nm;  
(b): Area changes at 556 nm

### 2.8 Cyt b<sub>5</sub> 光还原构象的变化

为了进一步了解连续 UV 光照射对蛋白质构象方面的影响。图 9 为 280 nm 照射 25 min 的 Cyt b<sub>5</sub> 前后荧光发射光谱图。Cyt b<sub>5</sub> 的 333 nm 是最大发射波长, 主要由生色氨基酸残基如 Trp, Tyr 和 Phe 周围环境变化引起<sup>[16]</sup>。随着光照时间的延长, 经 280 nm 单色光照射后的 Cyt b<sub>5</sub> 在 ~333 nm 处的荧光发射强度降低了 38%, 且最大发射波长红移到了 336 nm。表明 Cyt b<sub>5</sub> 芳香族氨基酸的微环境发生了改变。Trp<sup>22</sup> (Trp 位于蛋白一级结构第 22 位) 和 Cyt b<sub>5</sub> 的血红素可以发生较强的能量转移过程, Trp 的疏水环境遭到破坏, 亲水性越强, 能量越低<sup>[17]</sup>, 即连续 280 nm 照射 25 min 后, Cyt b<sub>5</sub> 中 Trp 的疏水区更加暴露于极性的水环境中。这种三级构象的改变也可能是由于蛋白质二级结构的改变而引发的<sup>[18]</sup>。由紫外可见光谱的确可以发现 Cyt b<sub>5</sub> 中有部分蛋白发生变性。

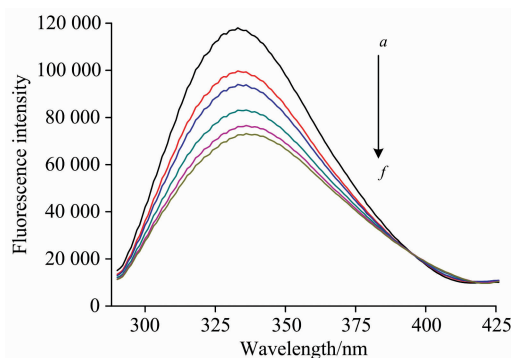


图 9 Cyt  $b_5$  在 280 nm 光照不同时间下的荧光光谱图  
a→f: 0, 5, 10, 15, 20, 25 min 光照时间荧光光谱图变化

Fig. 9 Fluorescence spectra of Cyt  $b_5$  at different irradiated time at 280 nm

From a to f, the irradiation times were 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, respectively

## 2.9 Cyt $b_5$ 光还原二级结构的变化

Cyt  $b_5$  的 CD 谱(350~700 nm)能够揭示蛋白质二级结构变化的信息<sup>[19]</sup>。如图 10 所示 208 和 222 nm 是 Cyt  $b_5$   $\alpha$ -螺旋结构的特征峰,随着光照时间的延长 Cyt  $b_5$  的 CD 谱图发生变化,208 和 222 nm 处负峰振幅明显减弱,CD 谱图的峰强度发生一定变化,但是形状和肩峰的位置未发生明显改变。部分  $\alpha$ -螺旋转变成  $\beta$ -折叠,说明随着 Cyt  $b_5$  光照还原的发生,蛋白质内部疏水残基基团的不断暴露,与荧光光谱结果一致,光照过程导致 Cyt  $b_5$  二级结构发生了一定改变,但是整个 Cyt  $b_5$  的二级结构仍以  $\alpha$ -螺旋为主,说明光照时间内 Cyt  $b_5$  蛋白未完全变性。

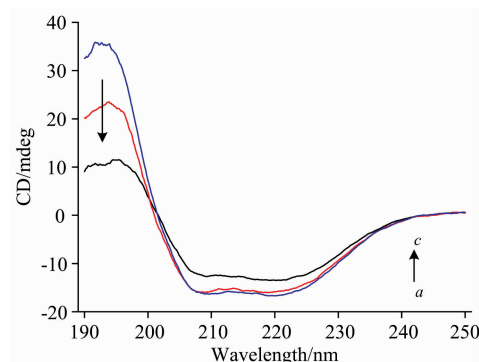


图 10 280 nm 氙灯照射后 Cyt  $b_5$  的 CD 光谱图  
光照时间从 a→c: 0, 10, 25 min

Fig. 10 CD spectra of Cyt  $b_5$  after irradiation with xenon lamp at 280 nm

From a to c, the irradiation times were 0, 10, 25 min, respectively

## 3 结 论

利用多种光谱学技术对光照射 Cyt  $b_5$  还原反应的依赖性和机理进行了探究。结果表明:选定氙灯 280 nm 波长照射下的 Cyt  $b_5$  溶液被还原,且随着光照时间的延长,还原程度越强。选定波长 280 nm 光照射,偏碱性条件利于 Cyt  $b_5$  的还原;Met、GSH 和咪唑的存在均能促进还原反应。荧光光谱以及圆二色光谱结果表明,Cyt  $b_5$  被光诱导还原后,蛋白主链结构更加伸展, $\alpha$ -螺旋含量降低, $\beta$ -折叠含量升高,但是整个 Cyt  $b_5$  的二级结构仍以  $\alpha$ -螺旋为主,说明光照时间内 Cyt  $b_5$  蛋白未变性。Cyt  $b_5$  被光还原的机理为从卟啉环到三价铁的电子转移,通过 280 nm 激发形成卟啉  $\pi$  阳离子基团和亚铁。以上的实验结果对于光诱导血红素蛋白质结构和功能的研究,具有重要的理论意义和实践价值。

## References

- [1] Johnson M P. Essays Biochemistry, 2016, 60(3): 255.
- [2] Wood W H J, MacGregor-Chatwin C, Barnett S F H, et al. Nature Plants, 2018, 4(2): 116.
- [3] Zheng T W, Li J, Zhang Y L, et al. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 10.
- [4] Ferapontova E E. Chem. Asian J, 2019, 14(21): 3773.
- [5] Duggal R, Denisov I G. FEBS Letters, 2018, 592(13): 2282.
- [6] Holien J K, Parker M V, Conley A J, et al. Current Protein & Peptide Science, 2017, 18(5): 515.
- [7] Amdahl M B, Petersen E B, Bocian K, et al. Biochemistry, 2019, 58(29): 3212.
- [8] Hilda M U, Mariana A M, Juan Horacio E R, et al. PLOS ONE, 2020, 15(4): 130. 232408.
- [9] Peter Guengerich F, Wilkey C J, Phan T T N. J Biol Chem, 2019, 294(28): 10928.
- [10] Lmdahl M B, Sparacino-Watkins C E, Corti P, et al. J. Biochemistry, 2017, 56(30): 3993.
- [11] ZHOU Hua-wei, CAO Hong-yu, TANG Qian, et al(周华伟, 曹洪玉, 唐 乾, 等). Acta Chim. Sinica(化学学报), 2011, 69(13): 1559.
- [12] AN Liang-mei, CAO Hong-yu, TANG Qian, et al(安良梅, 曹洪玉, 唐 乾, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2012, 28(7): 1461.
- [13] CAO Hong-yu, SHI Fei, TANG Qian, et al(曹洪玉, 史 飞, 唐 乾, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2017, 33(8): 1339.
- [14] Tang Q, Peng X J, Cao H Y, et al. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(4): 2054.

- [15] Consani C, Auböck G, Van M F, et al. *Science*, 2013, 339(6127): 1586.
- [16] Cao H Y, Liu Y W, Tang Q, et al. *Protein & Peptide Letters*, 2015, 22: 853.
- [17] Lakowica J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition. Science Press, 2008, 546.
- [18] Tang Q, Peng X J, Cao H Y, et al. *The Journal of Spectroscopy*, 2013, (9): 1.
- [19] Villar-Guerra R D, Trent J O, Chaires J B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2018, 57: 7171.

## Spectroscopic Study on the Mechanism of Photoreduction of Cytochrome b<sub>5</sub> by Ultraviolet Light

TANG Qian<sup>1, 3</sup>, HUANG Ting<sup>2, 3</sup>, GONG Ting-ting<sup>1, 3</sup>, CAO Hong-yu<sup>1, 3</sup>, WANG Ai-ling<sup>2, 3</sup>, WANG Li-hao<sup>2, 3</sup>, ZHENG Xue-fang<sup>1, 2, 3\*</sup>

1. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China

2. College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China

3. Liaoning Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China

**Abstract** The study of electron transfer in life has attracted much attention, and the research on the electron transfer of proteins and enzymes has become a hot spot. However, electron transfer may be an effective way to explain this mechanism. The detailed mechanism of photoinduced heme protein reduction is still unclear. In this paper, UV-visible absorption spectroscopy, steady-state fluorescence spectroscopy and circular dichroism spectroscopy were used to study the effects of different UV wavelengths systematically, pH, amino acids, Glutathione and Imidazole on the photoreduction of Cyt b<sub>5</sub> in vitro near-physiological environment to clarify the photoreduction mechanisms of Cyt b<sub>5</sub> which wasn't proposed by the traditional methods. The results show that ferric cytochrome b<sub>5</sub> can be photoreduced to the ferrous state by direct photoexcitation in the near-ultraviolet region. In this study, we studied the mechanism and facilitating conditions for photoreduction. Based on the sort band blue-shifted of 412 nm and absorbance intensity increase of Q band 556 nm, Cyt b<sub>5</sub>-Fe<sup>III</sup> in phosphate-buffered was photoreduced to Cyt b<sub>5</sub>-Fe<sup>II</sup> similar to the action of a chemical reducing agent occurs. Considering that the fixed wavelength, pH values, amino acids and ligands of photoreduction were irradiated by 280 nm light, Cyt b<sub>5</sub> had the strongest reduction degree. Under 280 nm alkaline conditions, Cyt b<sub>5</sub> had the strongest reduction degree; glutathione and imidazole promoted the photoreduction reaction by providing electron and hydrogen donors; free Met in solution promoted the photoreduction reaction at the maximum rate happened. The photoreduction mechanism of Cyt c was intramolecular electron transfer, including the formation of porphyrin cation radical as an active intermediate excited by 280 nm light. In addition, results of fluorescence and CD spectra indicated that the protein-peptide chain structure, while the secondary structure of the protein changes,  $\alpha$ -helix content decreased,  $\beta$ -sheet content increased. However, the secondary structure of Cyt b<sub>5</sub> is still dominated by  $\alpha$ -helix in the photoreduction process. Moreover, it provides a theoretical basis for the redox reaction and electron transfer mechanism in life.

**Keywords** Cytochrome b<sub>5</sub>; Photo-induced; Oxidation-Reduction Reaction; Spectroscopy

(Received Feb. 1, 2021; accepted Mar. 12, 2021)

\* Corresponding author