

# 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的纯化、结晶和专一性的比较

楼纯菊 沈永强 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

棉阿舒囊霉 (*Ashbya gossypii*) 细胞色素 C 可用氯化钠抽提法或乙酸乙酯自溶法从菌体中抽出, 经阳离子交换树脂 Zerolit 226 柱层析、硫酸铵分部沉淀及反透析后, 可被纯化和结晶。乙酸乙酯自溶法的抽提得率高于氯化钠抽提法。两种方法抽提及纯化的细胞色素 C 在电泳中都表现为均一, 但氯化钠抽提之细胞色素 C 的生物活力略高于用乙酸乙酯抽提的细胞色素 C。

氧化型细胞色素 C 的吸收峰为 409、420—430 毫微米。还原型为 415.5、521、550 毫微米。吡啶血色原的吸收峰为 414.5、520、550 毫微米。根据光谱特性, 上述色素属 C 型细胞色素。

结晶棉阿舒囊霉细胞色素 C 含铁量为 0.438%, 据此计算其最低分子量为 12,800。

用缺细胞色素 C 的心肌及棉阿舒囊霉线粒体的细胞色素氧化酶和琥珀酸氧化酶比较六种不同的细胞色素 C 的活力, 结果表明心肌及棉阿舒囊霉线粒体的细胞色素氧化酶对六种不同细胞色素 C 具有相同的专一性, 对六种不同细胞色素 C 的活力高低依次为棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 抽提) > 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯抽提) > 酵母细胞色素 C > 心肌细胞色素 C 部份 I > 心肌细胞色素 C 部份 II > 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551。而心肌琥珀酸氧化酶和棉阿舒囊霉线粒体琥珀酸氧化酶对六种不同的细胞色素 C 也具有相同专一性, 活力变化依次为酵母细胞色素 C > 棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 抽提) > 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯抽提) > 心肌细胞色素 C 部份 I > 心肌细胞色素 C 部份 II > 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551。

棉阿舒囊霉是核黄素的产生菌。在核黄素发酵过程中, 菌体在分化前呼吸途径主要是通过细胞色素系统, 随着菌体的分化, 线粒体上的细胞色素 C 首先脱落, 呼吸活力迅速下降, 而核黄素则大量合成<sup>[1]</sup>。由于细胞色素 C 是呼吸链的重要环节, 为研究棉阿舒囊霉呼吸途径的变化, 有必要对棉阿舒囊霉细胞色素 C 进行系统的研究。本文主要报道棉阿舒囊霉细胞色素 C 的抽提、纯化和结晶; 并以棉阿舒囊霉线粒体和牛心肌细胞色素氧化酶、琥珀酸氧化酶对不同来源的细胞色素 C 的专一性进行比较。

## 材料和方法

### (一) 菌种和培养方法

本文所用棉阿舒囊霉菌种及培养方法均与前文相同<sup>[1]</sup>。

### (二) 不同来源细胞色素 C 的制备

牛心肌细胞色素 C 按 Keilin 和 Hartree 方法制备<sup>[2]</sup>, 并按 Margoliash 方法<sup>[3]</sup>将心肌细胞色素 C 分成细胞色素 C I 和细胞色素 C II。荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551 按 Ambler<sup>[4]</sup>方法制备。酵母细胞色素 C 按邹承鲁<sup>[5,6]</sup>方法制备。

### (三) 酶制剂制备

缺细胞色素 C 心肌制剂按邹承鲁<sup>[5]</sup>和 Mar-

goliash<sup>[13]</sup> 方法制备。

缺细胞色素 C 棉阿舒囊霉线粒体的制备如下: 先按焦瑞身等<sup>[11]</sup> 的方法制备棉阿舒囊霉线粒体。将悬浮于蔗糖缓冲液(蔗糖 0.5 M, 磷酸缓冲液 0.1 M, pH 6.8, 乙二胺四乙酸钠 0.001 M, 柠檬酸钾 0.006 M) 的棉阿舒囊霉线粒体(蛋白质含量 20—25 毫克/毫升), 加 10 倍体积的 0.015 M, pH 7.0 的氯化钾溶液, 休克 10 分钟, 用 12,000 × g 离心 10 分钟, 弃去上清液, 沉淀再用 10 倍体积 0.1 M, pH 7.0 氯化钾, 抽提 10 分钟以除去细胞色素 C, 沉淀部分即缺细胞色素 C 棉阿舒囊霉线粒体制剂, 经分光镜观察证明绝大部分细胞色素 C 已除去。

#### (四) 酶活力测定

琥珀酸氧化酶及细胞色素氧化酶均用瓦氏呼吸器在 28℃ 测定, 活力以  $Q_o$  表示, 即每小时每毫克蛋白质所吸收氧的微升数。琥珀酸氧化酶反应系统内含琥珀酸钠 200 微克分子, Tris 缓冲液 200 微克分子、pH 6.8, 氯化镁 15 微克分子, 及细胞色素 C, 总体积 2.5 毫升, 最终蔗糖浓度为 0.2 M。细胞色素氧化酶反应系统内含抗坏血酸钠 10 毫克, 氯化镁 15 微克分子, Tris 200 微克分子、pH 6.8 及细胞色素 C, 总体积 2.5 毫升, 最终蔗糖浓度为 0.2 M。

#### (五) 分析方法

细胞色素 C 及吡啶血色原光谱用岛津 UV200 型分光光度计测定。

淀粉凝胶电泳参照潘家秀等<sup>[17]</sup> 方法。用 0.05 M, pH 6.0 磷酸缓冲液, 电压梯度为 5 伏/厘米, 电流 20 毫安, 电泳 5 小时, 以酸性蓝黑 10 B 鉴定蛋白质区带。

蛋白质按 Levin 和 Brauer 改进的双缩脲方法测定<sup>[41]</sup>。细胞色素 C 含铁量按 Doeg 和 Ziegler<sup>[9]</sup> 方法测定。吡啶血色原依照 Shichi 和 Hackett<sup>[10]</sup> 的方法制备和测定。

## 结果和讨论

### (一) 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的抽提、纯化和结晶

#### 1. 抽提方法的比较

细胞色素 C 的抽提现在一般用盐溶液

代替酸或溶剂处理, 以避免在抽提过程中使细胞色素 C 发生改变<sup>[13, 12-15]</sup>。

我们比较了几种抽提方法, 用金刚砂或冻化法破碎菌体, 或用菌体丙酮粉直接抽提效果都不好, 抽出液粘稠、混浊, 抽出之细胞色素 C 量也很少。但菌体用 10% 乙酸乙酯自溶或用 1 M NaCl 在较高 pH 下抽提, 细胞色素 C 就很易溶出, 而且抽出液很清, 纯化方便。用乙酸乙酯自溶法抽提的得率比 NaCl 抽提的高, 但用 NaCl 抽提法纯化的细胞色素 C 的生物活力略高于用乙酸乙酯自溶法抽提的细胞色素 C。由于乙酸乙酯抽提法得率高, 容易处理, 而且生物活力相差不大, 所以我们主要用乙酸乙酯法抽提。

#### 2. 细胞色素 C 的纯化和结晶

棉阿舒囊霉细胞色素 C 的纯化和结晶如图 1 所示。

用上述方法可将棉阿舒囊霉细胞色素 C 纯化 2000—3000 倍(表 1)。棉阿舒囊霉细胞色素 C 结晶见图版 I-1。

#### 3. 纯化的细胞色素 C 电泳

用两种抽提法抽提及纯化的细胞色素 C 在淀粉凝胶电泳中都为电泳均一, 将两种细胞色素 C 以等量混合后再电泳, 仍只有一条色带(图版 I-2), 说明二种提纯方法所纯化的细胞色素 C 在电泳性质上没有区别。

### (二) 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的一些性质

#### 1. 吸收光谱

棉阿舒囊霉细胞色素 C 的氧化、还原型吸收光谱如图 2 所示。氧化型吸收高峰为 409、520—530 毫微米, 还原型吸收高峰为 415.5、521、550 毫微米, 还原型  $\alpha$  带完全对称。

等消光点为 409.5、433、505、525.5、540 和 556.5 毫微米。

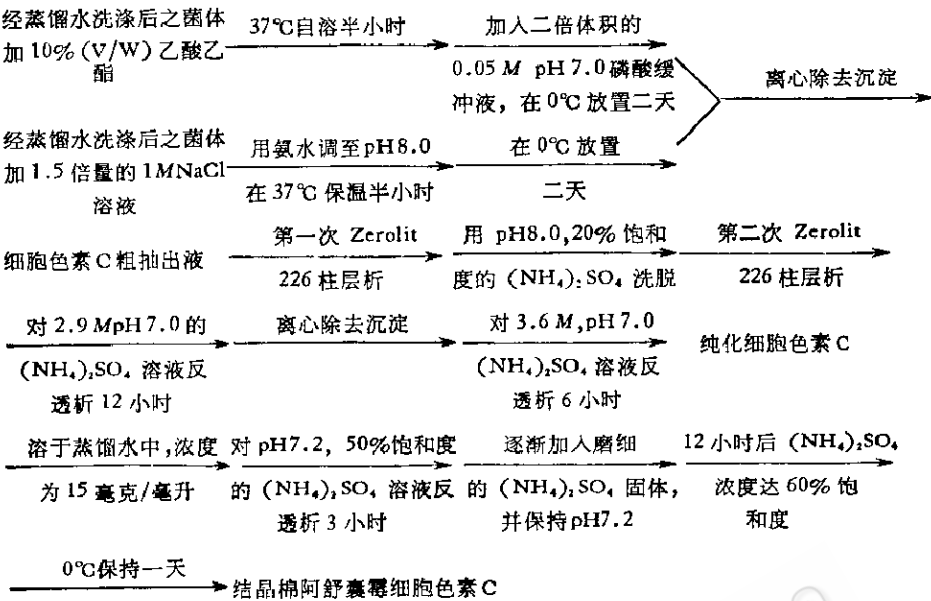


图 1 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的纯化和结晶流程图

表 1 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的纯化

提纯步骤	体积 (毫升)	蛋白质 A <sub>280</sub> 毫克/毫升	总蛋白质*	细胞色素 C 含量 (微克/毫升)	细胞色素 C 总量 (毫克)	回收 (%)	光谱纯度 $\frac{A_{550}}{A_{280}}$	光谱纯度 $\frac{A_{415}}{A_{280}}$	纯化 倍数	含铁 量 (%)
乙酸乙酯法粗抽出液	5980	47.5	283,050	31.2	186	100	0.0006	—	1	
第一次 Zerolit 226 洗脱	200	3	600	585	117	62	0.42	2.0	700	
第二次 Zerolit 226 洗脱	75	3.75	281	1072	80	42	0.64	3.0	1066	0.32
2.9 M 硫酸铵反透析	11	12	132	5655	62.2	33	1.01	5.0	1680	
3.6 M 硫酸铵反透析	4	22.8	91.2	13020	52.1	30	1.23	6.6	2116	0.438
结 晶										
氯化钠法粗抽出液	11305	43.5	491,767	8	100	100	0.00041	—	1	
第一次 Zerolit 226 洗脱	620	0.74	403	130	80.6	80.6	0.38	1.8	920	0.265
第二次 Zerolit 226 洗脱	70	2.46	149	702	49.1	49.1	0.63	3.1	1530	0.312
2.9 M 硫酸铵反透析	15	4.20	63	1872	28.1	28.1	0.96	5.8	2330	
3.6 M 硫酸铵反透析	2	26.4	52.8	13260	26.4	26.4	1.13	6.7	3170	0.38

\* 总蛋白质: A<sub>280</sub>毫克/毫升 × 毫升。

2. 含铁量及分子量

乙酸乙酯抽提及纯化的结晶细胞色素 C 对 10<sup>-4</sup> M 乙二胺四乙酸钠透析 8 小时, 再对二次重蒸玻璃蒸馏水透析过夜, 测得细胞色素 C 的含铁量为 0.438%。根据含铁量计算得棉阿舒囊霉细胞色素 C 的最低

分子量为 12,800。

3. 自身氧化

棉阿舒囊霉细胞色素 C 用微量连二亚硫酸钠还原后, 吹入空气不能使 550 毫微米波长的吸光率下降, 说明不能自身氧化。

#### 4. 辅基

棉阿舒囊霉细胞色素 C 用碱性吡啶处理,将酶蛋白部份离心除去,辅基的吡啶血色原吸收光谱如图 3 所示,吸收高峰为 414.5、520、550 毫微米,证明从棉阿舒囊霉所抽提出来的色素属于 C 属细胞色素,其辅基属典型的血红素 C<sup>[11]</sup>。

#### (三) 棉阿舒囊霉细胞色素 C 对一些氧化酶系专一性的比较

用不同的酶系比较各种不同来源细胞

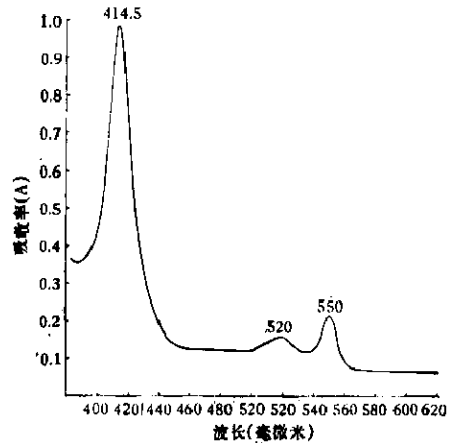


图 3 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的吡啶血色原(还原型)吸收光谱图

胞色素 C-551 基本没有活力(图 4)。用缺细胞色素 C 的心肌制剂的琥珀酸氧化酶比较结果是酵母细胞色素 C 活力最高,氯化钠抽提的棉阿舒囊霉细胞色素

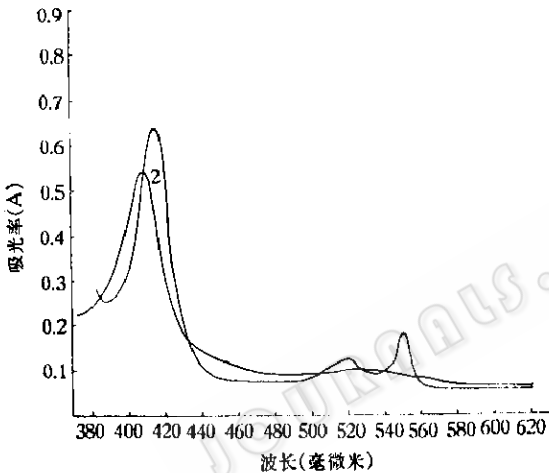


图 2 棉阿舒囊霉细胞色素 C 的吸收光谱图  
1. 还原型 2. 氧化型

色素 C 的专一性已有不少报道<sup>[16]</sup>。我们用缺细胞色素 C 心肌制剂的细胞色素氧化酶比较六种细胞色素 C 的活力。六种细胞色素 C 是酵母细胞色素 C, 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551、按 Margoliash<sup>[3]</sup>方法分成的心肌细胞色素 CI 及细胞色素 CII 和二种方法抽提的棉阿舒囊霉细胞色素 C。结果表明氯化钠法抽提的棉阿舒囊霉细胞色素 C 活力最高,乙酸乙酯法抽提的次之,酵母细胞色素 C 又次之,而心肌本身的细胞色素 C 的两个部份则更次,假单胞杆菌细

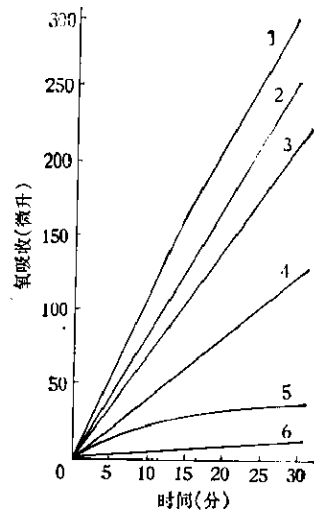


图 4 心肌细胞色素氧化酶对不同来源细胞色素 C 的活力

细胞色素 C 4.8 微克分子,心肌制剂蛋白质 4 毫克

1. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 法)
2. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯法)
3. 酵母细胞色素 C
4. 心肌细胞色素 CI
5. 心肌细胞色素 CII
6. 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551

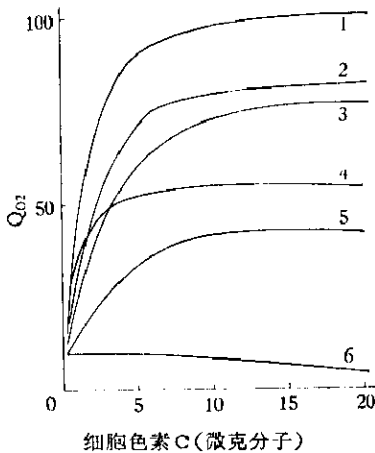


图 5 心肌琥珀酸氧化酶对不同来源细胞色素 C 的活力  
心肌制剂蛋白质 6 毫克

1. 酵母细胞色素 C
2. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 法)
3. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯法)
4. 心肌细胞色素 CI
5. 心肌细胞色素 CII
6. 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551

细胞色素氧化酶比较上述六种细胞色素 C 的活力, 其活力次序和心肌细胞色素氧化酶相同 (图 6)。而缺细胞色素 C 的棉阿舒囊霉线粒体琥珀酸氧化酶的活力次序又和心肌琥珀酸氧化酶相同 (图 7)。

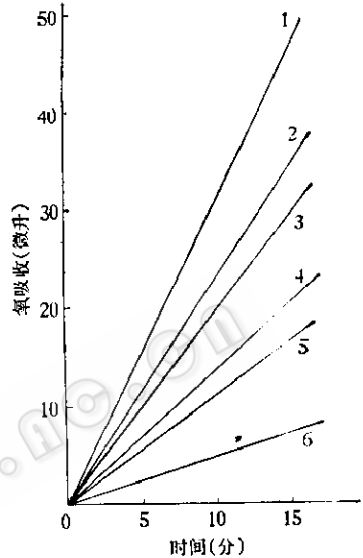


图 7 棉阿舒囊霉线粒体琥珀酸氧化酶对不同来源  
细胞色素 C 的活力

细胞色素 C 4.8 微克分子, 线粒体蛋白质 4 毫克

1. 酵母细胞色素 C
2. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 法)
3. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯法)
4. 心肌细胞色素 CI
5. 心肌细胞色素 CII
6. 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551

牛心肌细胞色素 C 的氨基酸排列顺序和酵母细胞色素 C 相比有一半左右的结构不同, 但在对心肌细胞色素氧化酶的专一性方面, 酵母细胞色素 C 的活力却比牛心肌本身的细胞色素 C 活力高一倍以上。Keilin 和 Hartree<sup>[17]</sup>曾报道外源细胞色素 C 的分子活力远较呼吸链颗粒制剂中原有的细胞色素 C 的活力为低。邹承鲁<sup>[5]</sup>认为很可能不是由于外源细胞色素 C 的蛋白变性, 而是由于没有使它和呼吸链酶系紧密结合。酵母细胞色素 C 促进活力可能正是由于这一半氨基酸顺序的变化而更紧密地和呼吸链结合。相反, 荧光假单胞杆菌细

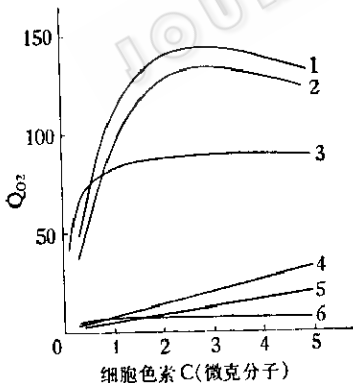


图 6 棉阿舒囊霉线粒体细胞色素氧化酶对  
不同来源细胞色素 C 的活力

线粒体制剂蛋白质 4 毫克

1. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (NaCl 法)
2. 棉阿舒囊霉细胞色素 C (乙酸乙酯法)
3. 酵母细胞色素 C
4. 心肌细胞色素 CI
5. 心肌细胞色素 CII
6. 荧光假单胞杆菌细胞色素 C-551

用缺细胞色素 C 的棉阿舒囊霉线粒体

胞色素 C-551 则完全不能结合, 因此完全没有活力。但尚缺乏证据, 需进一步研究。

棉阿舒囊霉和酵母在微生物分类上很接近, 因此二者的细胞色素 C 在生物活力上的相似表现是可以理解的。

### 参 考 文 献

- [1] 焦瑞身等: 实验生物学报, 9:270, 1964.
- [2] Slater, E. C.: *Biochem. J.*, 45: 1, 1949.
- [3] Margoliash, E.: *Biochem. J.*, 56: 529, 1954.
- [4] Ambler, R. P.: *Biochem. J.*, 89: 341, 1963.
- [5] Tsou, C. L.: *Biochem. J.*, 50: 493, 1952.
- [6] 李文杰、邹承鲁: 生理学报, 20:50, 1956.
- [7] 潘家秀等: 《蛋白质化学研究技术》, 科学出版社, 北京, 1962.
- [8] Levin, R. & R. W. Brauer: *J. Lab. Clin. Med.*, 38: 474, 1951.
- [9] Doeg, K. A. & D. M. Ziegler: *Arch. Biochem. Biophys.*, 97: 37, 1962.
- [10] Shichi, H. & D. P. Hackett: *J. Biol. Chem.*, 237: 2955, 1962.
- [11] Lemberg, R. & J. Barrett: *Cytochromes*, Academic Press, London and New York, 1973.
- [12] Hagihara, B. et al.: *J. Biochem.*, 45: 551, 1958.
- [13] Yamanaka, T. et al.: *J. Biochem.*, 46: 121, 1950.
- [14] Sels, A. A. & J. Zanen: *Arch. Internat. de Physiol. et de Biochim.*, 73: 532, 1965.
- [15] Margoliash, E. & O. F. Walasek: *Methods in Enzymology*, X Estabrook, R. W. & M. E. Pullman (eds), Academic Press, New York and London, 1967 pp. 339.
- [16] Yamanaka, T. & K. Okunuki: *J. Biol. Chem.*, 239: 1813, 1964.
- [17] Keilin, D. & E. F. Hartree: *Proc. Roy. Soc. Series B*, 129: 277, 1940.

## STUDIES ON CYTOCHROME C OF *ASHBYA GOSSYPII*— PURIFICATION, CRYSTALLIZATION AND COMPARISON OF ITS SPECIFICITY

Lou Chun-jin   Shen Yong-qiang   Jiao Rui-shen

(Section of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Cytochrome C of *Ashbya gossypii* was isolated from the mycelia by either NaCl extraction or ethyl acetate autolysis method. It had been purified and crystallized through repeated cation exchange on Zerolit 226 and ammonium sulfate fractionation.

The purified pigment was showed to be homogeneous on starch gel electrophoresis. Both the cytochrome C isolated by NaCl extraction and ethyl acetate autolysis had the same electrophoretic behavior, but the biological activity of cytochrome C isolated by the former method was much higher than that by the latter one.

The absorption spectra of oxidized

cytochrome C had peaks at 409, 420—430 nm and the reduced form had the major peaks at 415.5, 521 and 550 nm. The pyridine hemochromogen absorption spectra had peaks at 414.5, 520 and 550 nm. The above spectral characteristics of cytochrome demonstrated that the pigment belonged to the C-type of cytochrome.

Crystalline cytochrome C of *A. gossypii* was found to contain 0.438% of iron. The minimal molecular weight thus calculated was 12,800.

Cytochrome C preparation from six different sources were compared on the basis of their reactivities with cytochrome oxidase and succinoxidase of heart muscle.

preparation and *A. gossypii* mitochondrial fraction. It was observed both the cytochrome oxidase of heart muscle preparation and *A. gossypii* mitochondrial fraction had the similar specificities to the six preparations. The relative activities in decreasing order were as follows: *A. gossypii* cytochrome C (NaCl extraction) > *A. gossypii* cytochrome C (ethyl acetate autolysis) > yeast cytochrome C > heart muscle cytochrome C fraction I > heart muscle cytochrome C fraction II > *Pseudomonas fluorescens* cytochrome C-551. The succinoxidase of heart muscle

preparation and *A. gossypii* mitochondrial fraction also exhibited similar specificities to the six preparations, but the order of their relative activities was as follows: yeast cytochrome C > *A. gossypii* cytochrome C (NaCl extraction) > *A. gossypii* cytochrome C (ethyl acetate autolysis) > heart muscle cytochrome C fraction I > heart muscle cytochrome C fraction II > *Pseudomonas fluorescens* cytochrome C-551.

On the basis of these results, the specificity of *A. gossypii* cytochrome C was discussed.