科 学 通 报
第 42 卷 第 17 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 9 月

【研究简报】

研究金属酶活性中心结构 NMR 技术中的一种新方法

胡皆汉① 许永廷② 郑学仿① 程国宝①
(①中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023;②辽宁师范大学实验中心,大连 116021)

关键词 金属酶 铜锌超氧歧化酶 氯化钴 NMR

迄今为止,应用 NMR 技术研究金属酶活性中心配位结构所使用的方法,都是将金属酶中的抗磁离子(如 Zn(Ⅱ)等),或核弛豫不够快的顺磁离子(如 Cu(Ⅱ)等)进行重组置换为既是顺磁而且核弛豫也很快的金属离子(如 Co(Ⅱ),Ni(Ⅱ)等),从而使活性中心配位结构的 ^{1}H NMR 谱与酶其余结构部分的 ^{1}H NMR 谱分开,得以对金属酶活性中心配位结构进行直接研究[1~3]. 而重组方法,一般为利用 EDTA 等螯合剂,先将酶中的金属离子螯合出来经过透析,再用所需金属离子进行滴定重组,手续较繁. 而且该重组方法也不能进行有关金属离子与酶活性中心金属离子的直接相互作用研究. 本文则首次提出一种新方法,即直接外加氯化钴($CoCl_2$)于铜锌超氧歧化酶(Cu_2Zn_2SOD)溶液中,测其 ^{1}H NMR 谱来证实是否此方法可以用来研究这类金属酶活性中心配位结构,以及 $CoCl_2$ 与 Cu_2Zn_2SOD 间是否存在相互作用. 结果表明此新方法是可行的, $CoCl_2$ 与 Cu_2Zn_2SOD 间存在着相互作用.

1 实验

Cu_2Zn_2SOD 由河北大学生物工程研究所提供,未经再提纯,其酶比活为 10 000 u/mg,所有其他试剂为分析纯,实验所用蒸馏水为 2 次去离子水.

50 mg Cu_2Zn_2SOD 溶于 0.5 mL 50 mmol/L pH = 5.5 醋酸缓冲溶液中,直接加入无水 $CoCl_2$,使之加入量为 Co(Ⅱ):SOD 摩尔比为 4:1,混匀后装入 5 mm 双探头样品管中,放置 12 h 后,测其 ^{1}H NRM 谱.

实验仪器为 Bruker AC-80 型 NMR 波谱仪. ^{1}H NMR 频率为 80 MHz,采用 $1\bar{3}3\bar{1}$ 水峰压制脉冲序列,数据点为 8 K,谱宽 SW = 20 000 Hz,窗函数处理 LB = 20 Hz,化学位移以水峰作为参考(δ4.8).

11 Zen S, Kaji E. A novel synthesis for *dl*-aspartic acid and *dl*-glutamic acid. Bull Chem Soc Jpn, 1970, 43: 2 277
12 Kaji E, Zen S. The synthetic reactions of aliphatic nitro compounds Ⅵ: the synthesis of α-amino acids from the nitroacetate ester. Bull Chem Soc Jpn, 1973, 46: 337~338
13 Snyder H R, Katz L. The alkylation of aliphatic nitro compounds with gramine: a new synthesis of derivatives of tryptamine. J Am Chem Soc, 1947, 69: 3 140~3 142
14 Zen S, Kaji E. The formation of 4-substituted-3, 5-bismethoxycarbonylisoxazoline *N*-oxides via *O*-alkylation of nitroacetate with *n*-alkyl halides. Chem Pharm Bull, 1974, 22(2): 477~479

(1997-01-17 收稿,1997-04-28 收修改稿)

2 结果与讨论

图1为一定量的Cu_2Zn_2SOD缓冲溶液中，直接加入适量配比的$CoCl_2$，放置12 h后，测得的^1H NMR谱图. 此谱图与文献[4]中用重组方法得到Cu_2Co_2SOD的^1H NMR谱图比较，两者完全一致(如图中A与A′，B与B′). 这说明Cu_2Zn_2SOD溶液中直接加入$CoCl_2$后，在溶液中有Cu_2Co_2SOD存在，由于溶液中Co(Ⅱ)的唯一来源为$CoCl_2$，所以此结果不但证实了此方法是可以用来研究这类金属酶活性中心配位结构的，而且首次证实了Cu_2Zn_2SOD与$CoCl_2$间相互作用的存在. 作用结果$CoCl_2$中的Co(Ⅱ)可以置换Cu_2Zn_2SOD活性中心Zn位置上的Zn(Ⅱ)，而生成谱学中有意义的Cu_2Co_2SOD，为进一步研究这类金属酶配位结构打下基础. 最近我们又用有机金属配合物——氨基酸钴对Cu_2Zn_2SOD进行了直接相互作用的研究，实验揭示了氨基酸钴中的Co(Ⅱ)不但如无机$CoCl_2$中Co(Ⅱ)那样可以把酶中Zn位置上Zn(Ⅱ)置换出来，而且还可以把铜位置上Cu(Ⅱ)诱导出来，而形成E_2Co_2SOD(E:空位)，有关这方面的研究以后还要作详细报道.

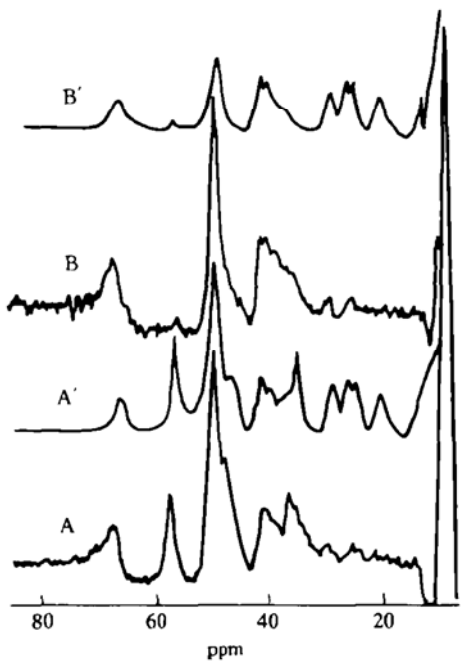

图1

A，B分别为Cu_2Zn_2SOD加入一定量$CoCl_2$后在H_2O, D_2O中测得的80 MHz ^1H NMR谱(采用$1\bar{3}3\bar{1}$脉冲序列压制水峰). A′，B′分别为Cu_2Co_2SOD在H_2O, D_2O中的200 MHz ^1H NMR谱[4](采用DEFT脉冲序列压制水峰). 以上谱图均为298 K pH 5.5醋酸缓冲溶液中记录的

这种新方法的建立，不但避免了繁琐的重组工作，而且开拓了用NMR技术直接研究外加无机金属化合物与金属酶活性中心金属离子的相互作用的先例. 为今后进一步研究众多金属酶与一些有生物学意义的生物小分子相互作用的研究，提供了更为直接、简便的方法，从而有可能加快这些领域的研究工作.

有关紫外光谱测试也进行了研究，并得到相同的结果，将另文发表.

参 考 文 献

1 Banci L, Bertini I, Luchinat C, et al. Characterization of cobalt (Ⅱ)——substituted superoxide dismutase-phosphate systems. Inorg Chem, 1987, 26: 153～156

2 Ming L J, Valentine J S. Preparation and characterization of Cu_2Ni_2 and Ag_2Ni_2 superoxide dismutase, two new metal-substituted derivatives. J Am Chem Soc, 1987, 109: 4 426～4 428

3 Ming L J, Valentine J S. NMR studies of Nickel (Ⅱ)——substituted derivatives of bovine copper-zinec superoxide dismutase with Nickel (Ⅱ) bound in the copper site. J Am Chem Soc, 1990, 112: 6 374～6 383

4 Bertini I, Piccioli M, et al. Copper-cobalt superoxide dismutase: a re-examination of the ^1H NMR spectrum through a novel selectively deuteriated derivative. Magn Reson in Chem, 1993, 31: S17～S22

(1996-10-28 收稿，1997-04-11 收修改稿)