中 国 科 学 (B 辑)
第23卷 第8期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1993年8月

铜锌超氧化物歧化酶活性中心铜与组氨酸的相互作用*

胡皆汉 舒占永
(中国科学院大连化学物理研究所，大连 116023)

摘 要

本工作应用电子自旋共振(ESR)和核磁共振(NMR)等手段深入研究了铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)在水溶液中与组氨酸的相互作用．发现酶活性中心的Cu(II)在水溶液中可以与外部物质进行交换相互作用，并不像固态那样稳定在络合位置上．Cu(II)与组氨酸形成络合物并在活性中心与络合物间达成动态平衡．酶活性同时受到相应的影响．本文同时介绍了其它氨基酸与酶的作用情况．

关键词 超氧化物歧化酶、组氨酸、ESR 谱、NMR 谱

CuZn-SOD 是一种广泛存在于动植物组织内的重要的金属酶．其生理功能为保护生物组织免受超氧负离子和羟基的氧化损伤．分子量在 31000—33000 范围[1]．其结构特征为八股反平行 β-折叠[2]，含有两个亚基．每个亚基含有一个由一个 Cu(II) 和一个 Zn(II) 及氨基酸构成的活性中心．在活性中心内 Cu(II) 与四个组氨酸分子和一个水分子形成五配位．所以，研究 CuZn-SOD 与氨基酸，特别是组氨酸的相互作用有重要的科学意义．本工作通过 ESR 和 NMR 等方法对该相互作用进行了较深入的研究．

1 实验和结果

本工作主要使用的牛血 CuZn-SOD 由上海东华生物化学公司提供，酶活标为 3600 u/mg．用来进行重复典型实验的高纯度酶由中国医学科学院血液研究所提供，酶活标为 3905 u/mg．酶活由邻苯三酚自氧化法测试得到．L-组氨酸为分析纯．ESR 装置为 JEOL-FE2XG，NMR 装置为 BRUKER-AC80．

1.1 ESR

在 CuZn-SOD 的活性中心内，四个组氨酸 N 原子与 Cu(II) 键合形成一个扭曲的四方平面，而水分子则处在这一平面的轴向位置上．所以，在这样的配位场中 Cu(II) 的 ESR 信号呈轴向对称．表 1 列出了不同状态下 CuZn-SOD 样品的 ESR 参数．随着在溶液中 SOD 浓度的

1992-07-29 收稿，1992-12-15 收修改稿．
* 国家自然科学基金资助项目．

变化，ESR 参数无明显改变.

浓度为 1.0×10^{-6} mol/ml 的 CuZn-SOD 水溶液由 16.0 mg 酶加入 0.5 ml 水中制成. 在直径为 1 mm 的石英毛细管中注入 5cm 长度的样品液柱. 在 15℃ 记录 ESR 谱. 然后分别向酶液中加入不同量的组氨酸，待充分作用后记录 ESR 信号如图 1. 实验发现在组氨酸加入后，样品的 ESR 信号出现了新的成分，其强度随着组氨酸的加入而增加，同时 CuZn-SOD 的信号强度则逐渐减小. 通过计算机差谱与 CuL_2 络合物的 ESR 谱的对比，新的成分被认为是铜离子与

表 1 固体、冷冻水溶液和水溶液 CuZn-SOD 的 ESR 参数

样 品	固 态	冷冻水溶液	水溶液
$g_{\parallel}$	2.225	2.219	2.214
$A_{\parallel}$ (mT)	16.0	14.8	14.8
$g_{\perp}$	2.012	2.009	2.021
$A_{\perp}$ (mT)	1.6	1.6	1.6

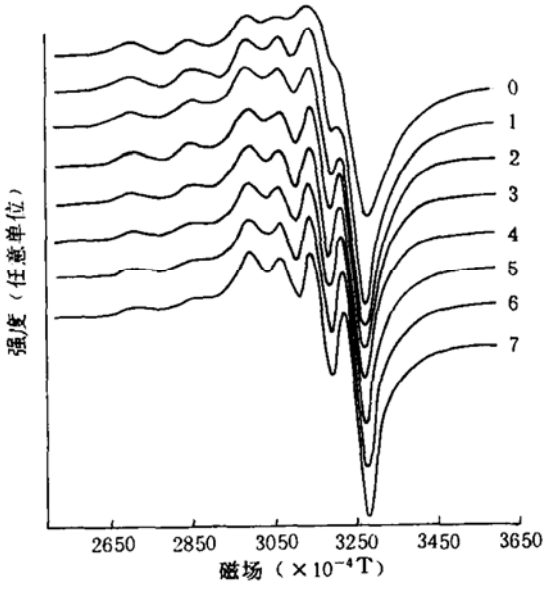

图 1 CuZn-SOD 水溶液及加入不同组氨酸量的 ESR 谱

酶液浓度为 0.001 mol/L, 0—7 对应的组氨酸量分别为 0, 0.015, 0.030, 0.060, 0.120, 0.500, 5.00 和 20.00 mg. 测量条件为：调制频率，100 kHz; 调制宽度，1.0 mT; 微波功率，5 mW; 微波频率，9.245 GHz; 测量温度，15℃

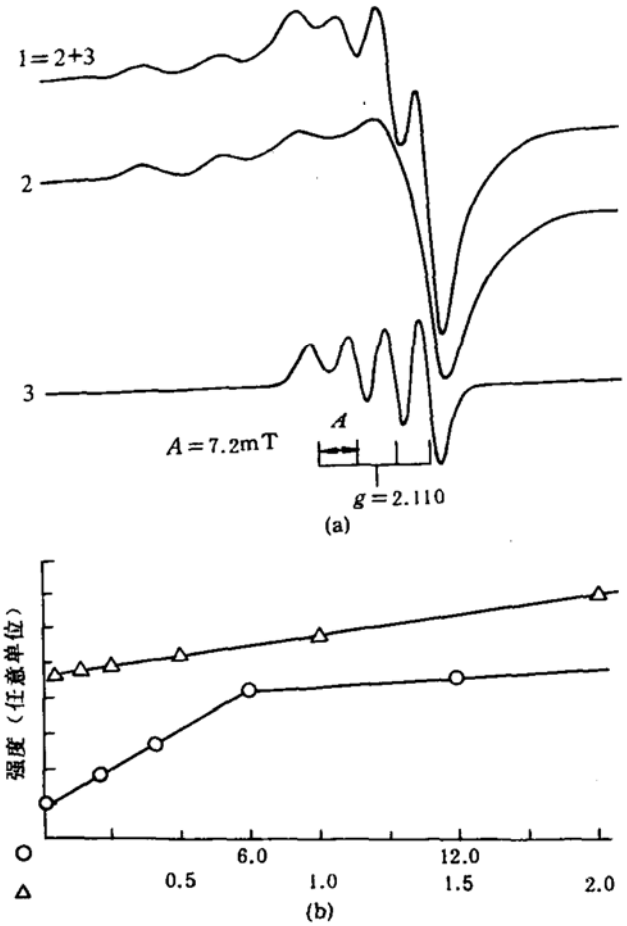

图 2 与组氨酸作用后的酶液的 ESR 谱的计算机分解图(a)；CuL_2 强度随组氨酸量的变化线型(b)

1——含组氨酸的酸液；2——纯酶液($g_{\parallel}=2.214$, $g_{\perp}=2.021$, $A_{\parallel}=14.8$ mT)； 3——CuL_2 络合物 ($g=2.110$, $A=7.2$ mT). 酶活 3600 u/mg； 溶液中共含有 16.0 mg CuZn-SOD，○为 $\times10^{-8}$ kg, △为 $\times10^{-5}$ kg

组氨酸络合形成的 CuL_2 络合物($g=2.110$, $A=7.2$mT)．图 2 给出了含有组氨酸酶液 ESR 谱的计算机分解图及 CuL_2 络合物的强度随组氨酸加入量的改变．在图中可看到 CuL_2 随组氨酸的增加成线性正比增加．不过有一个转折点把它分为两个阶段．而在高纯酶的实验中未发现该拐点．

实验在 −60℃ 下记录了酶液的低温 ESR 谱．同时记录了 ESR 谱在逐渐加入组氨酸后的变化，如图 3．从图中可以看到 ESR 谱的参数从纯酶时的值($A_{//}=14.8$mT)逐渐向 CuL_2 络合物的数值($A_{//}=18.3$mT)接近．

当含有组氨酸的酶液的温度被提高到 60℃(温度不超过 77.2℃ 对活性没有明显影响)后，更多的 CuL_2 成分形成了，并伴随有 CuZn-SOD 的信号的明显减小，如图 4．当温度重新下降到 15℃ 后，产物的分布则未回到原来的状态．

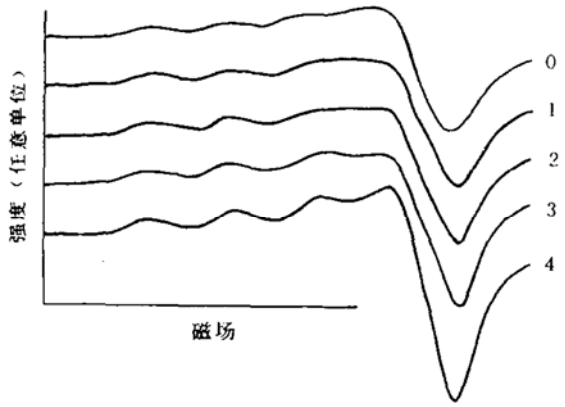

图 3　酶液的低温 ESR 谱(−60℃)及加入组氨酸后的变化

0—4 组氨酸量分别为：0, 1.0, 2.0, 4.0 和 20.0mg; $A_{//}$ 值依次为 14.8, 16.3, 16.8, 17.3 和 17.8mT

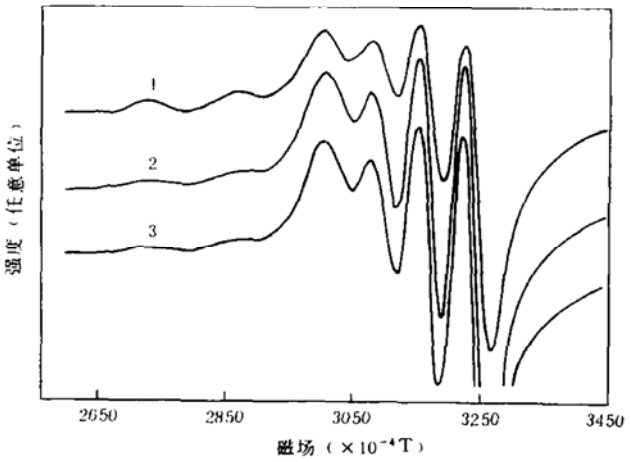

图 4　含有组氨酸的 CuZn-SOD 水溶液在升温前后的 ESR 谱

1—— 15℃, 2—— 升至 60℃, 3—— 再降至 15℃

为研究酶中铜离子的变化情况，我们首先取浓度为 1.3×10^{-3} mol/L 的组氨酸水溶液 0.10ml，然后逐渐加入总量为 1.0—7.0mg 的 CuZn-SOD，充分作用后分别记录其 ESR 信号．从谱的改变可以看到，SOD 和 CuL_2 的信号同时出现，并随 SOD 量的增加而同时增加．当 SOD 的量加到 5.0mg 时，CuL_2 的信号强度达到最大．继续增加 SOD 的量，CuL_2 的强度不再增加而 SOD 的信号则继续增加．

1.2 NMR

制备 0.5mol/L 的组氨酸水溶液并注入 NMR 样品管．用氘代二氧六环中心插管做内标，测量 NMR 谱后，向溶液中加入摩尔比为 1:20000 和 2:10000 的 CuZn-SOD．充分溶解后记录 ^{13}C NMR 谱的改变，如图 5．从图中可以看出，加入酶后组氨酸的各 ^{13}C 峰均不同程度地发生了宽化．化学位移为 29.0ppm 的峰宽化最小．内标的化学位移为 67.4ppm，其它各峰所对应的 ^{13}C 核见图 5．

1.3 酶活性分析

酶活性分析采用邻苯三酚自氧化法．所用缓冲液为 0.1mol/L 的 tris-HCl pH8.2(含 1.0×10^{-3} mol/L 的 EDTA · $2Na^+$)．紫外光波长为 325nm．

表2 酶活测试数据(邻苯三酚自氧化法)

	自氧化			加入纯酶液后			加入含组氨酸的酶液后		
测量序数	1	2	3	1	2	3	1	2	3
O.D.每隔30 s的光密度值	0.050	0.069	0.048	0.021	0.026	0.025	0.037	0.036	0.031
	0.095	0.113	0.093	0.034	0.039	0.039	0.057	0.055	0.051
	0.141	0.157	0.138	0.046	0.053	0.053	0.077	0.076	0.070
	0.186	0.201	0.183	0.060	0.067	0.067	0.097	0.097	0.090
	0.231	0.243	0.226	0.073	0.081	0.081	0.117	0.117	0.110
	0.274	0.284	0.268	0.087	0.096	0.097	0.137	0.139	0.130
ΔO.D.	0.044	0.043	0.043	0.013	0.014	0.014	0.020	0.021	0.020

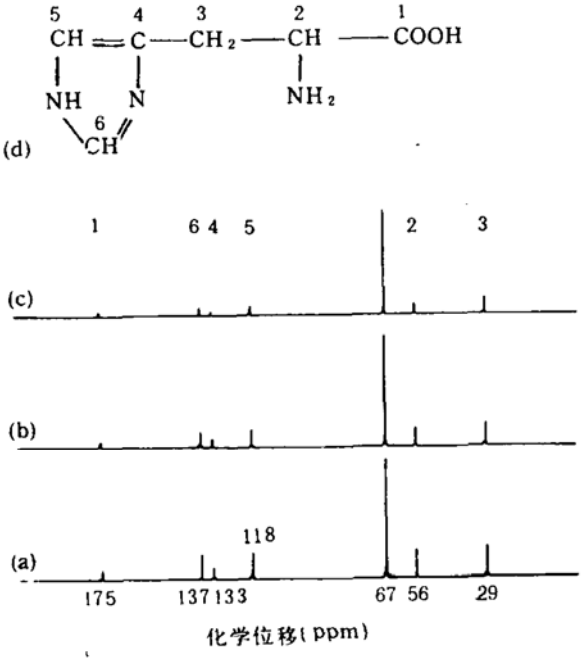

图5 组氨酸水溶液的^{13}C NMR谱及在加入少量CuZn-SOD后的变化

(a)0.5mol/L组氨酸水溶液, (b)加入摩尔比为1:20000的CuZn-SOD, (c)加入摩尔比为2:10000的CuZn-SOD, (d)与碳核对应的^{13}C峰

配制适当浓度的酶水溶液,然后分为相同的两部分.向其中之一加入组氨酸至0.5 mol/L. 两种酶液同样放置24 h后进行活性测量对比.并做三次以上重复实验.表2列出了其中三次测量的数值.计算得到的结果说明由于组氨酸的相互作用使得酶液的活性由1530±20 u/ml下降到1210+20 u/ml.

2 讨 论

酶液的常温和低温ESR谱都说明在组氨酸加入酶液后,酶液中形成了CuL_2络合物.而酶液中Cu的唯一来源是酶活性中心内的金属辅基Cu(II),所以说明Cu被组氨酸从活性中心内拉出来形成交换络合.随着组氨酸量的逐渐增加,CuL_2成分逐渐增多,同时CuZn-SOD的成分逐渐减少也证实了这一推断.

NMR的实验结果也说明由于CuZn-SOD的影响,组氨酸的^{13}C峰出现了普遍的宽化.正如我们在文献[3]中提到的一样,这种增宽效应来自于溶液中少量顺磁离子的交换络合所引起的驰豫造成的.同样由于溶液中引入的唯一的顺磁离子为SOD酶中的Cu(II),所以核磁共振的结果也为组氨酸对Cu的交换作用提供了有力的支持.而Cu的络合位置的选择则决定了处在组氨酸分子中不同位置的^{13}C核的谱峰的不同程度的宽化.

CuZn-SOD酶的活性由于组氨酸的作用而受到明显抑制.文献已经证实Cu(II)的丧失是酶活性下降的主要原因[4,5].因此,与ESR和NMR的分析一致,活性的改变也支持了组氨酸与酶的作用.

实验对 ESR 谱进行了定量分析．16.0mg 的 SOD 酶含有 1.0×10^{-6}mol 的 Cu．CuL_2 络合结构决定络合物的 Cu 与组氨酸的比例为 1:2．所以实验结果说明在交换作用的前一阶段大约有 20±3% 的 Cu 参与．在后一阶段的进一步相互作用则变得缓慢得多，每加入 1.0mol 的组氨酸只能拉出 0.001mol 的铜离子与之交换络合．在温度升高后更多的 Cu 可以参与络合，不过仍有一部分 Cu 保留在酶中．

从所得到的实验数据可以清楚地看出，即使在 SOD 远比组氨酸的摩尔数少时，也只有一部分 Cu 首先参与络合交换．前面实验中溶液里确定的组氨酸量为 1.3×10^{-7}mol，当加入 SOD 量为 3.1×10^{-7}mol 即 5.0mg 时，CuL_2 的成分达最大，说明此时溶液中的组氨酸量都已参与并形成了 CuL_2 络合．因而也说明有五分之一的 Cu 容易被组氨酸作用．

酶活为 3905u/mg 的 SOD 用来重复一些典型的实验结果，与前面实验的结果基本相同，只是在 CuL_2 强度随组氨酸量的变化线型上没有一个明显的转折点．

在所用的酶样品中，部分 Cu 易于首先参与作用．其中一个原因可能是在酶的纯化过程中部分氨基酸残基从大分子上脱离，导致了活性中心的更为暴露；在纯酶的水溶液中就能观察到有少量的 CuL_2 络合物与这一分析吻合，同时在高纯性酶样品中未观察到 CuL_2 产物的强度转折点也支持这一观点．另外一种可能的原因是酶分子或者两个亚基的三维结构存在着一定的差异，这一点与 Frieden 所提出的一半部位催化机理相一致[6]．在 CuZn-SOD 和组氨酸的水溶液中，Cu(II) 在酶活性中心和 CuL_2 络合结构间形成动态平衡．并由于 SOD 酶大分子结构的限制使 Cu(II) 倾向于 CuL_2，这一点与升温后有更多的络合物产生相一致．

我们也用具有短直链的丙氨酸和牛血 SOD 不含有的分子量很大的色氨酸进行了这一研究．得到与组氨酸相类似的结果．只是比组氨酸对酶中 Cu 的作用稍弱一些．考虑到 CuZn-SOD 的生理功能，我们需注意氨基酸对它的这一影响．

致谢　中国科学院大连化学物理研究所 201 组的邵昌平副研究员，辽宁师范大学实验中心的许永廷老师分别在活性分析和 NMR 实验上给予很大帮助，在此一并表示衷心的感谢．

参　考　文　献

[1] 方允中、李文杰，自由基与酶，科学出版社，北京，1989.
[2] Richardson, J. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, **72**: 1349.
[3] 胡皆汉、刘宏申等，科学通报，1991, **36**(10): 1711.
[4] Rotilio, G. *et al.*, *Biochemistry*, 1972, **11**: 217.
[5] Been, K. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**: 7298.
[6] Frieden, E. M. *et al.*, *Biochem. J.*, 1974, **139**: 49.