

## 蛇毒内 NAD 糖苷水解酶活性中心 Cu(II)配位环境的 EPR 研究

刘清亮\* 陈立新 瞿保钧 梁任又 黄婉治

(中国科学技术大学 合肥 安徽 230026)

为了解皖南尖吻蝥蛇毒中 NAD 糖苷水解酶内 Cu(II)的配位情况,我们着重研究了它的 EPR 谱,从得到的谱图,对应的  $g$  因子和超精细分裂表明 NADase 内的 Cu(II)至少与三个氮原子相配位,并且呈变形的平面四边形。该结果与 Cu(II)模型配合物的 EPR 比较显示, NADase 中与 Cu(II)配位的氮原子可能来源于 NADase 分子侧链上组氨酸的咪唑集团。

关键词: 铜 水解酶 蛇毒 顺磁共振

NAD 糖苷水解酶,简称 NADase,广泛存在于微生物和动物的不同组织或毒液中,能催化水解 NAD 为等摩尔的尼克酰胺和嘌呤二磷酸核糖,并参与腺苷二磷酸核糖基化反应和多腺苷二磷酸核糖的合成,人们对此越来越感兴趣<sup>[1]</sup>。黄婉治等<sup>[2]</sup>从皖南尖吻蝥蛇毒液中提纯得到 NADase,发现它是由两个相同亚基组成、含糖 33%的糖蛋白,分子量约为十万,每个酶分子内含有一个 Cu(II)离子,铜离子起稳定构象和催化活性的作用<sup>[3]</sup>。

为进一步探讨 NADase 分子中 Cu(II)离子结合部位的构象,我们测定了皖南尖吻蝥蛇毒的 NADase 在不同状态和不同温度的 EPR 谱,得到了它们的  $g$  因子 ( $g_{\perp}$  和  $g_{\parallel}$ )和超精细分裂常数  $A(A_{\perp}$  和  $A_{\parallel})$ ,并由此获取了一些 Cu(II)配位结构的有益信息。

## 实 验

### 一.样品制备:

皖南尖吻蝥蛇毒 NAD 糖苷水解酶是粗毒经多步层析分离得到<sup>[3]</sup>,在 SDS 电泳上为一条带。纯化得到的 NADase 干粉直接进行固体样品的 EPR 谱测定,或溶于已配制好的缓冲溶液中含  $0.02\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaAc 和 20% 体积比的 DMF,去进行溶液样品的 EPR 谱测定。

### 二.仪器和测试条件:

固态和溶液样品,室温和 100K 温度下的 EPR 谱均在 ER-200D-SRC-10/12 电子顺磁共振仪(西德, Bruker)上测量得到。微波频率 $\sim 9\text{GHz}$ ,内标用 DPPH,即  $\alpha\alpha'$ -二苯基- $\beta$ -苦基肼基,它的  $g$  因子等于  $2.0037 \pm 0.0002$ 。频率由微波控制器 ER048H 监视,磁场由核磁共振计 ER035M 准确测量。还有一些其他条件,标在具体的图谱上。

本文于1990年1月25日收到。

国家自然科学基金资助课题。

\* 通讯联系人。

## 结果和讨论

NADase 固体粉末室温下的 EPR 谱(见图 1a)充分显示了它的顺磁性, 低温的 EPR 谱的超精细分裂信号更加清晰(图 1b), 两者均为非轴对称的各向异性, 表明了 NADase 铜配位结构的复杂性。为了得到 NADase 的 EPR 分裂更多有效的信息, 并便于同模型小分子铜配合物的结构信息相比较, 我们着重研究了 NADase 在水溶液状态下的 EPR 性质。NADase 在  $0.02\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{NaAc}$  和 20%(体积比)DMF 的水溶液中, 室温下的 EPR 谱并未显示出更多的分裂和结构信息(图 2a)。温度降至 100K 时, 测出的 EPR 谱表示在图 2b 上, 它显示了较多的信息, 给出了较好的结果。

溶液内存在的溶剂化效应和低温下较高的分辨率, 使低温 NADase 溶液的 EPR 谱给出了比固体状态和室温溶液状态更细致和更明显的分裂峰。从图 2b 中可以清楚地看到, 在  $g_{\perp}$  低场区至少有七个拐点,  $g_{\parallel}$  方向上也出现了附加的分裂。根据  $(2nI+1)$  规则,  $^{14}\text{N}$  的  $I$  为 1, 由超精细分裂的个数可确定在赤道平面上应至少有三个氮原子与  $\text{Cu}(\text{II})$  配位。

图 1 粉末状态 NADase 的 X-带 EPR 谱

Fig.1 X-band EPR spectra of NADase at

solid state. Measuring condition:

a: 5.0 Gpp, room temperature, 80 mW,

b: 5.0 Gpp, 100K, 50mW

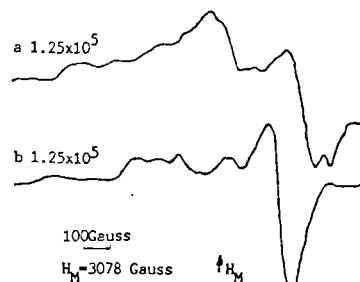
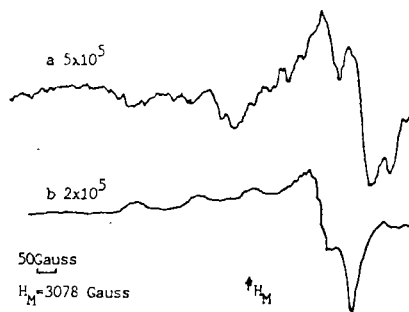


图 2 溶液状态 NADase 的 X-带 EPR 谱

Fig.2 X-band EPR spectra of NADase at

aqueous solution. Measuring condition:

a: 10 Gpp, room temperature, 20mW,

b: 6.3 Gpp, 100K, 20mW

$g_{\perp}$  低场区测出的超精细分裂峰间的宽度, 即 N 原子超精细分裂常数,  $A_{\text{N}(\perp)} = 14 \text{ Gauss}$ ,  $g_{\parallel}$  方向上的  $A_{\text{N}(\parallel)} = 20 \text{ Gauss}$ , 这是赤道平面上与  $\text{Cu}(\text{II})$  配位的氮原子引起的超精细分裂的结果。另外, 溶液的 NADase 测出的 EPR 谱表现了更强的各向异性, 即  $g_x \neq g_y$ , 说明分子内  $\text{Cu}(\text{II})$  离子周围的配位是偏离平面正方形, 不存在  $D_{4h}$  对称轴。

铜蛋白中的 1 型铜和 2 型铜是由  $\text{Cu}(\text{II})$  的超精细分裂常数的大小来区分的, 大于  $140 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  的为 2 型铜, 小于的为 1 型铜。NADase 溶液的低温 EPR 谱得到的  $A_{\text{Cu}(\text{II})} = 180 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ , 显然为 2 型铜。一般认为 2 型铜是 3 个或 4 个组氨酸的咪唑氮形成平面正方形或近似结构的结果, 牛血清胺氧化酶<sup>[5]</sup> 和半乳糖氧化酶<sup>[6]</sup> 属于 2 型铜, EPR 谱均显示了轴对称性。我们测出的 NADase 的 EPR 谱为 2 型铜, 但是为各向异性, 这可能是 NADase 分子内

组氨酸的空间结构或化学环境不同造成的配位变形引起的。

表 1 NADase 和其他 Cu(II)模型配合物在溶液状态下的 EPR 参数值

Table 1 EPR Parameters on NADase and Model Complexes of Cu(II) in Aqueous Solution

| complex                           | pH   | $g$<br>(298K) | $g_{11}$<br>(100K) | $g_{\perp}$<br>(100K) | $g$<br>(100K) | $A^*$<br>(298K) | $A_{11}^*$<br>(100K) | $A_{\perp}^*$<br>(100K) |
|-----------------------------------|------|---------------|--------------------|-----------------------|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
| Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> | 4.5  | 2.206         | 2.357              | 2.075                 | 2.169         | 60.7            | 152                  | 15.1                    |
| Cu(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> | 10.0 | 2.138         | 2.248              | 2.065                 | 2.126         | 69.8            | 190                  | 9.7                     |
| CuHL                              | 5.5  | 2.119         | 2.205              | 2.056<br>2.019        | 2.100         | 74.2            | 185                  | 18.8                    |
| Cu(Imi) <sub>4</sub>              | 7.0  | 2.142         | 2.261              | 2.055                 | 2.124         | 66.0            | 190                  | 4.0                     |
| Cu(Pyr) <sub>4</sub>              | 6.0  | 2.164         | 2.269              | 2.058                 | 2.128         | 63.7            | 186                  | 2.6                     |
| CuEDTA                            | 5.5  | 2.157         | 2.290              | 2.067                 | 2.141         | 65.4            | 160                  | 18.1                    |
| NADase                            | 7.0  |               | 2.231              | 2.046<br>2.009        | 2.095         |                 | 180                  |                         |

\* unit:  $\times 10^{-4}\text{cm}^{-1}$

我们把 NADase 的 EPR 参数与我们实验测定的模型小分子铜配合物的 EPR 结果进行了比较。表 1 给出了所有的数据, 表内的 Cu(Pyr)<sub>4</sub>, Cu(Imi)<sub>4</sub> 分别为铜的吡啶和咪唑的配合物, HL 为 5, 5, 7, 12, 12, 14-六甲基-1, 4, 8, 11-四氮杂环四癸烷-N-醋酸。从  $g$  因子和超精细分裂常数  $A$  的数值比较发现, NADase 的 EPR 结果最接近于 CuHL 和 Cu(Imi)<sub>4</sub> 配合物, 说明 NADase 分子内是侧链上组氨酸的咪唑氮参加了铜的配位, 而不是半胱氨酸, 同时在配位结构上可能类似于 Cu(HL), 为氮和氧的混合配位。NADase 的 EPR 谱显示出各向异性, 与 Cu(HL)相一致, 而与 Cu(Imi)不一致, 这说明 NADase 分子内铜的配位情况更类似于 Cu(HL)的状况。

### 参 考 文 献

- (1) Vost, D. A. et al., *J. Biol. Chem.*, **256**, 3647 (1981).
- (2) 黄婉治等, 尖吻蝾蛇毒NADase中铜离子与构象的活性关系, 第三次全国生物无机化学学术会论文摘要集, B11, 广州, (1989).
- (3) 卢明, 尖吻蝾蛇NAD糖苷水解酶, 毕业论文, 中国科学技术大学 (1988).
- (4) 陈立新, 皖南尖吻蝾蛇NAD糖苷水解酶活性中心Cu(II)配位及其小分子模型化合物的EPR研究, 硕士论文, 中国科学技术大学, (1989).
- (5) Suzuki, S. et al., *Biochemistry*, **25**, 338(1986).
- (6) Driscoll, J. J., Kosman, D. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1765(1987).

## STUDIES ON THE Cu(II) COORDINATION IN NAD GLYCOHYDROLASE FROM SNAKE VENOM BY EPR SPECTRA

Liu Qingliang Chen Lixin Qu Baojun Liang Renyou Huang Wanzhi

(University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026)

The EPR spectra on the NAD glycohydrolase from snake venom at room and low temperature have been studied to investigate the Cu(II) coordination in the molecule. The spectrum in solution at low temperature and its corresponding  $g$  factors and hyperfine splittings show that at least three nitrogen atoms are bounded to Cu(II) and the structure is the planar square with some distortion. From the comparison with some model Cu(II) complexes, it can be followed that the nitrogen atoms coordinated to Cu(II) may be from the imidazol groups in histidines of NAD glycohydrolase.

**Keywords:** copper glycohydrolase snake venom EPR