

金属置换碳酸酐酶及其生成动力学

黄仲贤 胡红雨*

(复旦大学化学系, 上海 200433)

本文报道了金属置换碳酸酐酶的活性研究。指出了离子半径的大小, 配位构型的要求, 热力学稳定性和配位体交换动力学是决定各种金属置换碳酸酐酶活性的重要因素。并用金属置换法测定了 Ni(II) 与 apo-CA 形成金属酶的反应动力学速率常数。在 25℃、pH7.47 时, $k_{\text{Ni(II)-CA}}$ 为 $14.0 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, 较之于 Zn(II)-CA 的速率常数小 10^3 倍。Cd(II)-CA 的生成动力学为一快反应, 采用配位竞争法, 在邻菲罗啉配位剂存在下, 测得了 Cd(II)-CA 生成动力学的条件速率常数在 *o*-phen 浓度为 1.96 和 $2.92 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时分别为 137.1 和 $114.6 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ 。这一研究提示了镉对生物体的毒性作用的一个重要方面是使锌酶失活。而配位剂的存在大大降低了镉与脱辅基锌酶的反应动力学, 这也是它们显示解毒功能所在。

关键词: 碳酸酐酶 金属置换酶 生成动力学

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA, E.C.4.2.1.1.)是哺乳动物红细胞中的含锌金属酶, 主要催化体内 CO_2 的水合反应和碳酸的脱水反应。在体外, 它还能催化多种酯类如乙酸对硝基苯酚酯(para-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)的水解⁽¹⁾, 这也是离体测定碳酸酐酶活性的主要方法。

Zn(II)离子是 CA 保持催化活性必不可少的, 是酶的活性中心^(2,3)。Zn(II)离子可以被其他二价金属离子所替代, 这些金属离子与酶蛋白的配位性质和催化性能的关系⁽⁴⁾及 Zn(II)、Co(II)与脱辅基碳酸酐酶(apo-CA)形成金属酶的反应动力学⁽⁵⁾的研究, 受到人们广泛的重视。本文研究了碳酸酐酶的几种过渡金属置换酶的活性和金属配位性质的关系, 讨论了金属置换反应的机理。并采用金属置换法测定了 Ni(II)与 apo-CA 形成金属酶的反应动力学速率常数, 并提出了应用配位竞争法研究 Cd(II)-CA 金属置换酶生成反应动力学。

实 验

材料、试剂及处理方法 牛红血球碳酸酐酶(Bovine Carbonic Anhydrase, BCA, 生化试剂), 购自上海生化所东风试剂厂, 未经进一步纯化(或自备⁽⁶⁾), 其他试剂均为分析纯(A.R.)。所用缓冲液以去离子水配制, 并用双硫脲- CCl_4 萃取处理至无金属离子。所有玻璃器皿均经 EDTA 溶液处理, 以去金属离子杂质。蛋白质浓度测定用紫外吸收光谱($\epsilon_{280\text{nm}} = 5.7 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$), 在日本产岛津 UV-240 紫外-可见分光光度计上进行。

Apo-CA 的制备 BCA 100mg, 溶于 6ml pH5.09, $0.010 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 邻菲罗啉- $0.10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 乙

本文于1990年10月15日收到。

本课题为国家自然科学基金委员会资助课题。

* 现在中科院上海生化所。

酸钠(phen-acetate)缓冲液中, 4,000rpm 离心 20 分钟。上清液装于透析袋中, 在 4℃ 下不断搅拌透析, 每隔两天更换一次透析液 (phen-acetate)。一周后转至 pH7.50、 $0.010\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ tris- $0.10\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl 缓冲液中透析, 每隔两小时更换一次透析液 (若有沉淀, 离心除去)。制备的 apo-CA 转置于无离子存在的容器中, 低温保存备用, 其残存酯酶活力为 1.3%。

酶活力测定 13.6mg *p*-NPA($3\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)溶于 1.0ml 丙酮, 加去离子水并搅拌, 定容于 25ml (新鲜配制)。在 1.0cm 比色皿中, 加入 1.0ml *p*-NPA, 2.0ml $0.02\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ tris-HCl(pH7.5)缓冲液, 而后分别加定量 apo-CA, CA, M(II)-CA。反应物混合后三分钟内用岛津 UV-240 紫外-可见分光光度计上测定在 348nm 处吸光度 A_{348} 值的变化, 其变化率即表示酶的活力。

M(II)-CA 的活力测定 所用的 apo-CA 浓度为 $2.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 。分别取 50 μl apo-CA, 加入过量的 Zn(II)、Co(II)、Mn(II)、Ni(II)、Cu(II)、Cd(II)等金属离子, 迅速混合后测定这些金属置换酶的活性及它们再被 Zn(II)重新置换后的活力恢复。

Ni(II)、Cd(II)-CA 的形成动力学 所用 apo-CA 初始浓度 $7.5 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 。将一定量 (1.0ml) apo-CA 和 $0.1\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH7.47tris-HCl 缓冲液混合, 使其总体积为 5ml, 25℃ 恒温, 加入过量的 Ni^{2+} 或 Cd^{2+} , 使溶液中金属离子浓度为 $1.02 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (约过量 7 倍)。反应额定时间内取样, 加入等量 Zn^{2+} 后测定其酶活力, 以推算反应体系中 apo-CA 量 (忽略 Zn^{2+} 置换 M(II)-CA 过程), 进而求出速率常数。

结 果 和 讨 论

一.M(II)-CA 的活性和性质

表 1 apo-CA 和 M(II)-CA 的活力比较

Table 1 Comparison of Activities of apo-CA and M(II)-CA*

species M(II)-CA	esterase activity	relative esterase activity(%)	esterase activity after adding Zn^{2+}	relative activity after adding Zn^{2+} (%)
apo-CA	0.006	1.3	0.447	
Zn(II)-CA	0.477	100		
Co(II)-CA	0.464	97.5		
Mn(II)-CA	0.011	2.2	0.255	53.5
Cu(II)-CA	0.017	3.8	0.022	4.6
Ni(II)-CA	0.004	0.9	0.396	83.0
Cd(II)-CA	0.001	~0	0.010	2.1

* enzyme activity was calculated by monitoring the absorption (A_{348}) at λ_{348} nm with the reaction time of 2 minutes

Apo-CA 和 M(II)-CA 的酯酶活性比较见表 1, 其 A_{348} 对时间 t 曲线如图 1。Co(II)-CA 和 Zn(II)-CA 的相对活性为 97.5%, 表明 Co(II)是碳酸酐酶中 Zn(II)的极好替代物。但是, 以 Mn(II)、Ni(II)、Cu(II)、Cd(II)离子取代的金属置换酶都不具有活性或活性很低。其中 Mn(II)、Ni(II)-CA 中的金属离子可被 Zn^{2+} 重新取代而使酶活力恢复; 而 Cu(II)、Cd(II)-CA 中的金属离子都不能被 Zn^{2+} 取代。虽然 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等与脱辅基碳酸酐酶的键合部位被认为是与 Zn^{2+} 一致的^[7], 但它们表现出不同酶活性是与它们的配位化学性质紧密联系的。其中最主要的是离子半径金属配合物构型要求、热力学稳定常数, 以及配体交换速率和水交换速率等^[3]。各种二价金属离子与 apo-CA 形成配合物的热力学和动力学常

数见表 2⁽⁸⁾。金属置换碳酸酐酶的稳定常数 $\lg K(\text{pH} 5.5)$ 和水溶液中质子释放速率随 pH 变化各不一样, 而 $\text{Zn(II)}-\text{CA}$ 和 $\text{Co(II)}-\text{CA}$ 却表现出两者在 CO_2 水合和酯水解酶活性上的相似之处。这是由于 Zn(II) 和 Co(II) 离子有相同的离子半径 ($0.74 \text{ \AA}$), 两者都倾向于形成四面体配位构型, 和相近的交换动力学性质。与此相反, Ni(II) 离子尽管与 apo-CA 生成 $\text{Ni(II)}-\text{CA}$ 的热力学稳定性与 Zn(II) 、 Cd(II) 相当, 但由于水交换动力学的惰性, 其生成动力学反应速率常数要小得多。因此, Zn(II) 能够置换 $\text{Ni(II)}-\text{CA}$ 中的 Ni(II) 离子, 使酯酶活性恢复。二价镉离子的情况正好相反。这表明在金属酶的生成过程中, 金属离子与配体及水的交换速率, 在决定酶活性上是不可忽略的因素⁽⁷⁾。

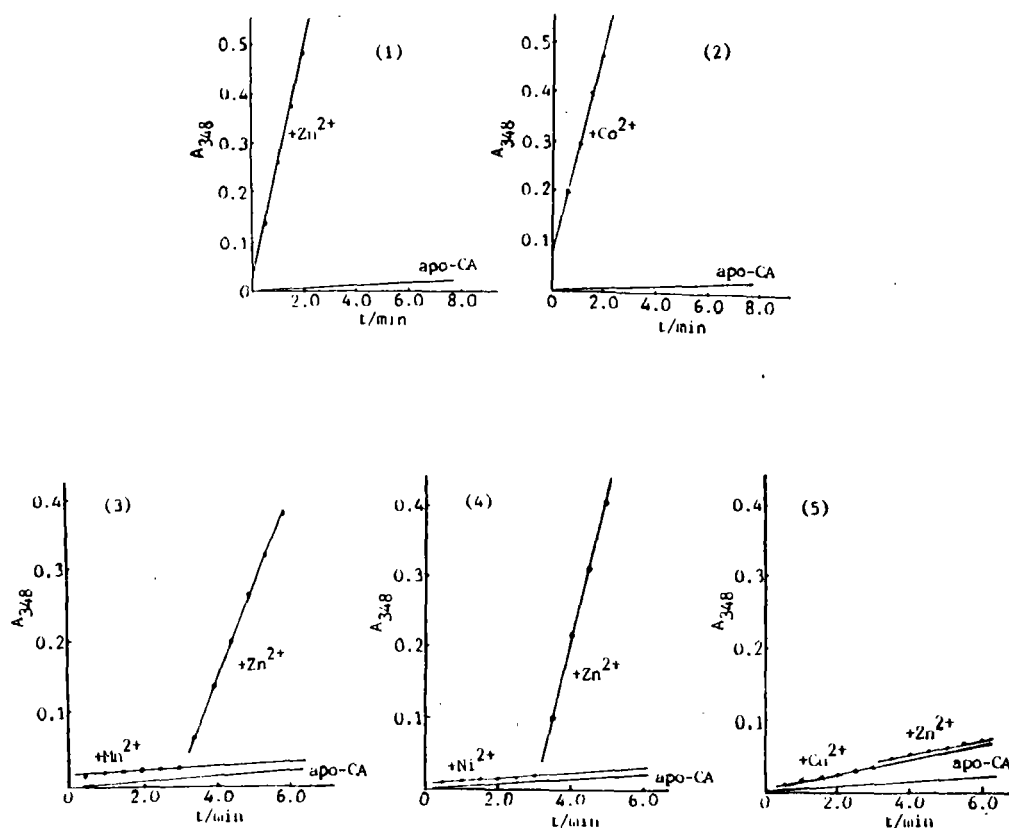


图 1 碳酸酐酶及其金属置换酶活性

Fig.1 Activities of CA and its metal derivatives

system: 1.0ml *p*-NPA + 2.0ml pH7.5 tris-HCl + 50 μl apo-CA ($2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

(1) adding 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$; (2) adding 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Co}^{2+}$;

(3) adding 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Mn}^{2+}$; (4) adding 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Ni}^{2+}$;

(5) adding 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Cd}^{2+}$;

Three minutes later, 25 μl $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ was added to the mixtures respectively in (3), (4), (5).

螯合剂 1, 10-邻菲罗啉 (*o*-phenanthroline, *o*-phen)存在条件下, 利用 *o*-phen 与 apo-CA 竞争配位溶液中的 Cd^{2+} , 抑制 apo-CA 与 $\text{Cd}(\text{II})$ 离子的反应, 降低了 Cd^{2+} 与 apo-CA 形成复合物的反应速率。实验结果表明, 在 25℃, pH7.47, *o*-phen 浓度分别为 $1.96 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $2.92 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时, Cd^{2+} 与 apo-CA 形成 $\text{Cd}(\text{II})$ -CA 的速率常数 $k_{\text{TCd}(\text{II})\text{-CA}}$ 分别为 137.1 和 114.6 $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 。很显然, 随着 *o*-phen 浓度增大, $k_{\text{TCd}(\text{II})\text{-CA}}$ 也随之下降。当然, 比较 $\text{Zn}(\text{II})$ -CA 和 $\text{Cd}(\text{II})$ -CA 的生成速率常数, 本工作测得的 $k_{\text{TCd}(\text{II})\text{-CA}}$ 为条件速率常数。但这一动力学研究从一个侧面证实了镉对生物体的毒性作用一个重要方面是与锌离子竞争, 使某些含锌酶失活。联系到生物体中的金属硫蛋白 (metallothioneins, MT), 利用其卓越的重金属配位能力所表现的解毒作用, 以及 $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT}$ 仍然有效地提供锌离子, 具有激活 apo-CA 的能力。表明无论是小分子配合剂还是生物高分子都可以有效地抑制重金属对生物体的毒性。

参 考 文 献

- [1] Pocker, Y., Stone, J.T., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5479(1965).
- [2] Christianson, D.W., Lipscomb, W.N., *Acc. Chem. Res.*, **22**, 62(1989).
- [3] 黄仲贤, 科学, **40**(2), 123(1988).
- [4] Wilkins, R.G., Williams, K.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2241(1974).
- [5] Henkens, R.W., Sturtevant, J.M., *ibid*, **90**, 2269(1968).
- [6] Lindskog, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 218(1960).
- [7] Bertili, I. et al., in: *Structure and Bonding*, vol. 48 (Biochemistry), Clarke, M.J.(ed.), p.55-59, Springer-verlag, Berlin, 1982.
- [8] Lindskog, S., Nyman, P.O., *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 462(1964).
- [9] Lindskog, S. et al., In: *The Enzyme*, Boyer, P.D., (ed.), **5**, 587(1972).

METAL SUBSTITUTED CARBONIC ANHYDRASE AND THEIR FORMATION KINETICS

Huang Zhongxian Hu Hongyu

(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai, 200433)

The activities of Co(II), Mn(II), Ni(II), Cu(II) and Cd(II) metal substituted carbonic anhydrases(CA) have been studied. The results indicate that the crucial factors manipulating the enzyme activity are the metal ionic radius, the coincidence of coordination geometry, the thermodynamic stability constants of metal ions with apo-CA and the ligand (especially the water molecule) exchange kinetics on metal ions. The formation rate constant of Ni(II)-CA has been spectrophotometrically measured by a metal substitution reaction. Under the conditions of 25°C and pH 7.57 the $k_f, \text{Ni(II)-CA} = 14.0 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ which is about 10^3 times slower than the formation rate constant of Zn(II)-CA. Cadmium ion forming Cd(II)-CA with apo-CA has rather fast kinetics. Usually, it is difficult to determine the rate constant. Here, the apparent rate constants of Cd(II)-CA formation in the presence of competitive ligand such as *o*-phenanthroline has been successfully estimated. With different condition of *o*-phen at 1.96 and $2.92 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ the rate constants of Cd(II)-CA formation, 137.1 and 114.6 $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ have been obtained respectively. The studies remind us that the toxicity of cadmium is the results of the inactivation of essential zinc-containing metalloenzymes. The chelating agents function as a scavenger of toxic material cadmium by inhibiting the formation of Cd(II)-enzyme.

Keywords: carbonic anhydrase metal substituted enzyme kinetics of metalloenzyme formation