

鼠脑 GIF 的提取及其与脱锌碳酸酐酶的供锌动力学研究

郑起 刘芳 黄仲贤*
(复旦大学化学系, 上海 200433)

本文从大鼠脑组织中提取了 GIF, 并研究了它与 apo CA 之间的锌转移反应, 计算出不同温度下 GIF 的供锌速率, 并进一步求出了供锌过程的热力学常数。

关键词: 金属硫蛋白 生长抑制因子 碳酸酐酶 供锌动力学
分类号: O614.24

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类重金属结合蛋白, 它在一些重金属(Cd、Pb、Hg)的解毒及 Zn、Cu 等体内必需微量金属元素的代谢过程中起到重要作用。氨基酸组成与 MT1 和 MT2 有着广泛同源性的 MT3, 又称作生长抑制因子(growth inhibitory factor, GIF), 它存在于哺乳动物的脑组织当中, 具有抑制神经细胞生长的作用^[1]。除此之外, GIF 也可能具有其它 MT 所共有的性质, 如涉及微量锌元素的平衡与转移^[2]。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

雄性 Wister 大鼠, 250 g 左右, 购于中科院上海实验动物中心。Sephadex G-75、G-25、DEAE-52 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。牛碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)购自 Sigma 公司。其余化学试剂均为分析纯。HP8452A 紫外分光光度计。310 原子吸收分光光谱仪。TOMY SEIKO CO. LTD. Model RS-20 III 高速离心机。

1.2 GIF 的分离提纯

由于 GIF 中含有一价 CuI , 故提纯过程中需维持还原气氛, 以保证 GIF 的活性。

取鼠脑 89.7 g, 剪碎后以液氮冷冻, 并于研钵中研碎, 加入少量巯基乙醇。以 300 mL 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4, 含 1 mmol·L⁻¹ DTT) - 无水乙醇-氯仿(体积比 1:1:0.08)作匀浆液匀浆。4℃下以 43000 g 离心 15 分钟, 取上清 275 mL, 加入-20℃预冷的无水乙醇 740 mL, 4℃下静置 1 小时, 12800 g 离心 15 分钟。弃上清, 沉淀溶于 5 mL 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4, 含 0.5 mmol·L⁻¹ DTT), 17000 g 离心 10 分钟, 取上清直接上 Sephadex G-75 柱($\Phi 2.7 \times 80.0$ cm), 以相同缓冲液淋洗, 流速 0.34 mL·min⁻¹。流出液以 UV-Vis 光谱监测 262 nm 的吸光度变化, 合并 GIF 峰, 上 DEAE-52 柱($\Phi 1.8 \times 10.0$ cm), 以 5 ~ 200 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5, 含 0.5 mmol·L⁻¹ DTT) 线性梯度洗脱, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 监测 262 nm 的紫外吸收, 并测定流出液的原子吸收光谱。Sephadex G-25 柱以 N₂饱和过的 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5, 经 dithizone/ CCl_4 去除金属离子)预平衡, GIF 冷冻干燥后经此柱($\Phi 2.0 \times 45.0$ cm)脱盐, 以相同缓冲液淋洗, 所得样品于-20℃、N₂气氛下保存。

收稿日期: 1999-11-03。

国家自然科学基金资助项目(No. 29671008)。

* 通讯联系人。

第一作者: 郑起, 男, 27 岁, 硕士, 工程师; 研究方向: 生物无机化学与蛋白质化学。

GIF 的金属含量以原子吸收光谱测定, 蛋白浓度以 4, 4'-二硫二吡啶滴定测定。

1.3 GIF 的供锌动力学研究

碳酸酐酶的处理及锌转移实验方法见文献^[3], 反应体系选择为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲体系(pH 7.5)。

2 结果与讨论

鼠脑匀浆、沉淀, Sephadex G-75 和 DEAE-52 柱分离及 Sephadex G-25 柱脱盐后, 最终获得纯蛋白 0.72 mg, 平均每个大鼠脑含 $24 \mu\text{g}$ 。所得 GIF 蛋白中约含 Zn 3 ~ 4 份, Cu 4 ~ 5 份。

GIF 经 Sephadex G-75 柱和 DEAE-52 柱的流出曲线分别见 Fig. 1 和 Fig. 2, GIF 的 UV-Vis 谱见 Fig. 3。

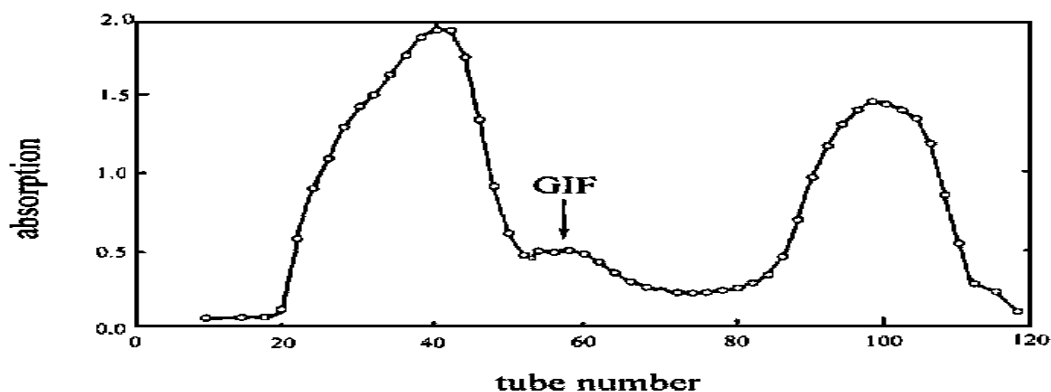


图 1 鼠脑中可溶性蛋白组分的 Sephadex G-75 柱色谱图

Fig. 1 Sephadex G 75 column chromatography of the soluble protein fraction from brains of rats. The elution profiles of absorbance at 262nm were indicated.

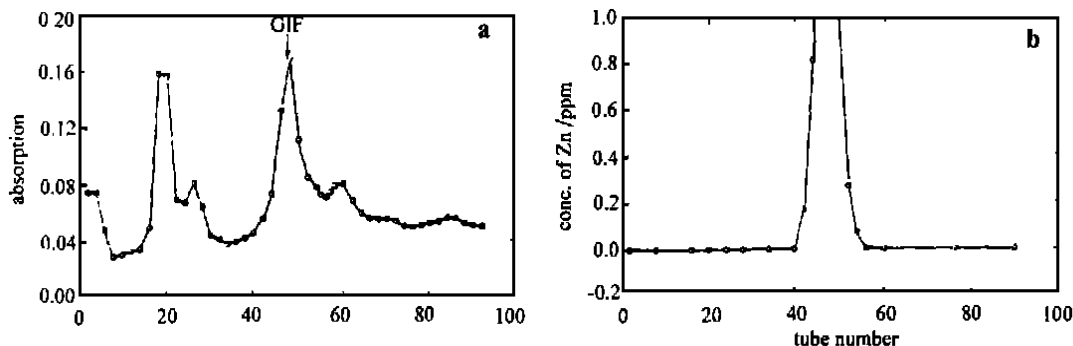


图 2 75% 乙醇分级的金属蛋白的 DEAE 52 聚葡萄糖树脂色谱图

Fig. 2 DEAE 52 cellulose chromatography of 75% alcohol fractionated metalloproteins. Sample in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl, pH7. 4, containing $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dithiothreitol, were applied to a column ($\Phi 1.8 \times 10.0 \text{ cm}$) of DEAE cellulose equilibrate with the same buffer. The column was washed with linear gradient of $0.005 \sim 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl, pH7. 5, containing $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dithiothreitol. The elution was monitored by absorbances at 262 nm. (a) and by atomic absorption spectroscopy (determining zinc) (b)

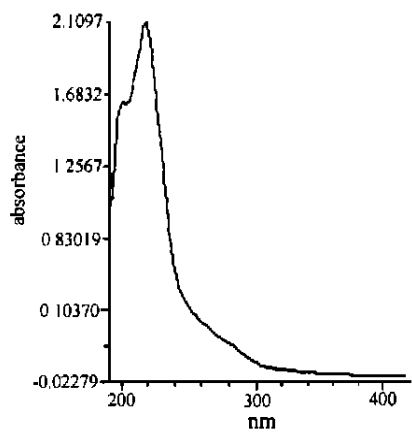


图 3 鼠 GIF 的紫外吸收光谱
Fig. 3 Ultraviolet absorption spectrum of rat GIF

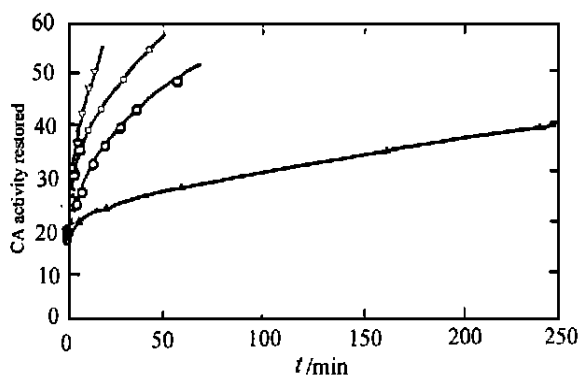


图 4 不同温度时鼠 GIF 重建脱锌碳酸酐酶活性
Fig. 4 Restoration of apo-CA activity by rat GIF at various temperatures. The symbols are :
○ : 25℃ □: 30℃ ▲: 0℃ ▽: 37℃

apo-CA 的活性恢复率随 GIF: apo-CA 的比例不同而异, Fig. 4 给出了 1:1 条件下, 不同温度时的 GIF 与 apo-CA 间的锌转移反应的进程曲线。可知在通常条件下, 1 份 GIF 只能向 apo-CA 提供 1 份 Zn^{2+} 。25℃下, 经过 1 小时, GIF 可使等浓度的 apo-CA 恢复 50% 的酶活力。与 MT1 和 MT2 相比较, GIF 有着更为持久的供锌能力。同等条件下, MT1 和 MT2 最多只能达到 50%, 见 Fig. 5。推测这是由于 GIF 比 MT1 和 MT2 多出 6 个氨基酸, 因而它的肽链相对松散, 造成锌离子的活泼性相对更大, 这点可由金属离子的取代反应得到证实^[4]。

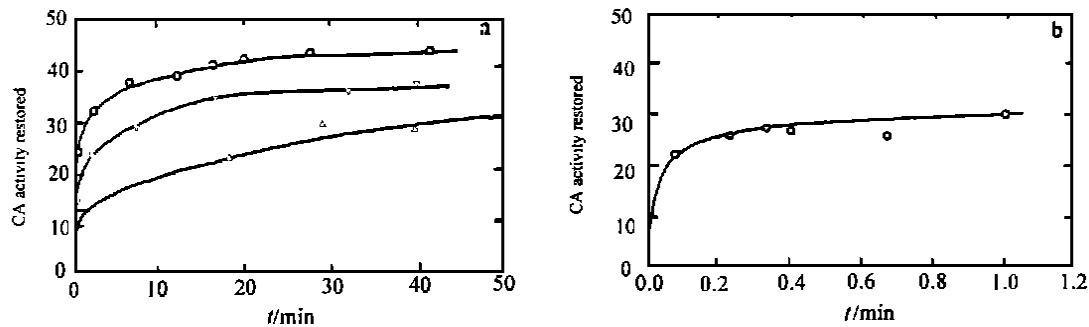


图 5 脱锌碳酸酐酶活性被不同的金属硫蛋白重建图
Fig. 5 Restoration of apo-CA activity by various metallothioneins. The symbols are:
○ : $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ △: $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ ▽: $\text{Zn}_4\text{-}\alpha(\text{MT1})$ in (a) and $\text{Zn}_4\text{-}\alpha(\text{MT2})$ in (b)

以 $\ln([\text{GIF}]/[\text{apo-CA}]) \sim t$ 作图, 可得到一系列直线(Fig. 6), 说明反应符合二级速率方程式:

$$\ln([\text{GIF}]/[\text{apo-CA}]) = ([\text{GIF}]_0 - [\text{apo-CA}]_0) k_2 t - \ln([\text{GIF}]_0/[\text{apo-CA}]_0)$$

由各直线的斜率计算所得反应二级速率常数列于表 1。以 $\ln k_2 \sim 1/T$ 作图, 可得图 Fig. 7。

并可进一步求出上述供锌过程的热力学常数:

$$\begin{aligned} \text{活化能 } E_a &= 60.152 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ \text{活化焓 } \Delta_r H^\ddagger &= 57.673 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

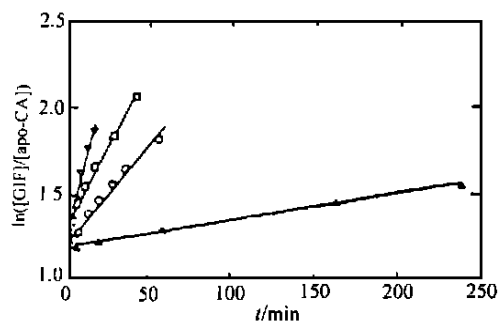


图 6 $\ln([GIF]/[apo-CA])$ 对时间图
Fig. 6 Plot of $\ln([GIF]/[apo-CA])$ versus time.
The symbols are identical to those in Fig. 4

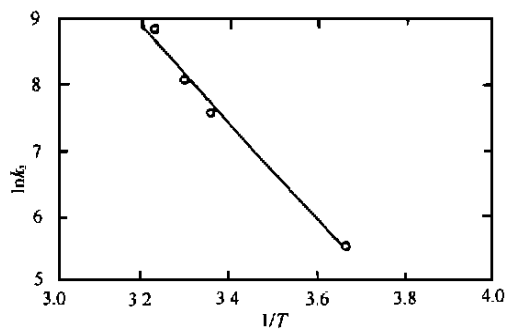


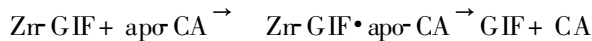
图 7 脱锌碳酸酐酶活性被鼠 GIF 重建的温度依赖性
Fig. 7 Temperature dependence of the reconstitution of apo-CA by rat GIF. Reaction mixtures were incubated at temperatures between 0 and $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Assays for recovery of activity were then run at 25°C .

活化熵 $\Delta_r S^\ddagger = -22.684 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

表 1 不同温度下的碳酸酐酶恢复率及二级速度常数

Table 1 Restoration of apo-CA Second Order Rate Constants at Various Temperature		
T	restoration percentage%	$k_2/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
0°C	> 39.29	2.525×10^2
25°C	> 48.14	1.926×10^3
30°C	> 54.39	3.161×10^3
37°C	> 49.31	6.661×10^3

负的活化熵表明反应的速率决定步骤是蛋白-蛋白之间的相互结合过程。因而这个反应历程与 MT 相似,可写作:



GIF 的供锌动力学实验表明,除了生长抑制作用外, GIF 确实具有调控 Zn^{2+} 在生物分子之间转移的能力。这预示着 GIF 可能具有多样化的功能,除了已报道的与老年痴呆症 (Alzheimer's disease, AD) 有关外^[5,6],它还可以以多种其它方式影响着大脑神经系统的正常生命活动。

参 考 文 献

[1] Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. *Neuron*, **1991**, *7*, 337.
[2] Vallee B. L. *Neurochem. Int.*, **1995**, *27*, 23.
[3] Huang Z.-X., Hu H.-Y., Gu W.-Q., Sun J.-Q. *Chinese J. Chem.*, **1993**, *11*, 246.
[4] Pountney D. L., Fundel S. M., Faller P., Birchler N. E., Hunziker P., Vasak M. *FEBS Letter*, **1994**, *345*, 193.
[5] Uchida Y., Ihara Y., Tomonaga M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, *150*, 1263.
[6] Uchida Y., Tomonaga M. *Brain Res.*, **1989**, *481*, 190.

Isolation of GIF from the Rat Brain and Study of Zinc Transfer Kinetics with apo Carbonic Anhydrase

ZHENG Qi LIU Fang HUANG Zhong-Xian
(*Chemistry Department of Fudan University, Shanghai 200433*)

Metallothionein III, a kind of growth inhibitory factor(GIF) , was isolated and purified from the rat brain. Its zinc transfer reaction with apo-carbonic anhydrase was studied and the zinc transfer rate constants and thermodynamic parameters were obtained.

Keywords: metallothionein GIF carbonic anhydrase kinetics