

# Raman 光谱研究铜锌超氧化物歧化酶 及其金属取代衍生物的二级结构

汤银燕 王志林 郁清 耿金龙 罗勤慧\*

(南京大学配位化学研究所, 南京 210093)

本文测定了铜锌超氧化物歧化酶 ( $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ ) 及其金属取代衍生物  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  的 Raman 光谱, 对图谱进行了归属, 并定量测定了两种 SOD 的二级结构, 同时对结构与活性的关系进行了讨论。

关键词: 超氧化物歧化酶 Raman 光谱 二级结构

分类号: O614.24

铜锌超氧化物歧化酶广泛存在于多种有机体中, 其主要功能之一是催化超氧自由基发生歧化反应生成过氧化氢和氧气<sup>[1]</sup>, 因而它可清除机体内的超氧自由基。SOD 的功能与其结构有着极其紧密的关系, 因此, 对其结构尤其是二级结构的研究已引起人们的广泛兴趣<sup>[2-4]</sup>。常用于测定蛋白二级结构的方法有 X-射线晶体结构分析法<sup>[5]</sup>, 多维核磁共振法<sup>[6,7]</sup>, 圆二色谱<sup>[8,9]</sup>, 红外光谱<sup>[10]</sup>等。Raman 光谱也是测定蛋白结构的一种有力手段<sup>[11,12]</sup>, Spiro T. G. 工作小组使用 Raman 光谱对多种蛋白进行了广泛而深入的研究<sup>[13-15]</sup>。1985 年 Lepork J. R. 曾对从 yeast 中分离的  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  的 Raman 光谱进行了归属<sup>[16]</sup>, 但用 Raman 光谱定量测定  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  及其金属取代衍生物的二级结构至今还未见报导。本文测定了  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  及其金属取代衍生物  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  的 Raman 光谱。同时通过  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  水溶液及重水溶液冻干粉末的 Raman 谱图定量计算了它的二级结构含量, 其结果与 X-射线晶体结构分析法<sup>[4]</sup>得出的结论十分吻合, 继而推广到其金属衍生物  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$ , 将所得的结果与  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  进行了比较, 并对结构与活性的关系进行了讨论。

## 1 实验部分

### 1.1 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 及其衍生物的制备

铜锌超氧化物歧化酶 ( $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ ) 从牛血中依文献<sup>[17]</sup>提取并纯化, 其摩尔质量为  $32800\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。电感耦合等离子发射光谱测得铜锌含量分别为 0.38% 和 0.39%, 黄嘌呤氧化酶法测得其活性为  $6000\text{单位} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 其 EPR 和 UV 光谱与文献<sup>[17]</sup>一致。  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  按文献<sup>[18]</sup>方法获得, Cu, Ni 含量分别为 0.370% 和 0.352%, 其电子光谱与文献<sup>[18]</sup>值基本一致。

将 SOD 分别溶于  $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7.0) 和  $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{K}_2\text{DPO}_4\text{-KD}_2\text{PO}_4$  (pD: 7.0) 的缓冲溶液中, SOD 的浓度为  $20 \sim 30\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 新配制的溶液在  $4^\circ\text{C}$  的环境中放置 6~8 小时后直至 H/D 交换基本平衡后, 冻干成粉末。

### 1.2 Raman 光谱的测定

收稿日期: 2000-11-08。收修改稿日期: 2000-12-25。

国家自然科学基金资助项目 (No. 29831010)。

\* 通讯联系人。

第一作者: 汤银燕, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

所有 Raman 谱图均在(25℃)用 RFS100 FT-Raman 光谱仪以 80mW 的功率测定, Raman 谱图中两个最低点间的连线为基线(溶剂分子振动峰除外)测得峰高, 计算其相对强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Raman 谱图的定性分析

$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  及其金属取代衍生物  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  的粉末 Raman 谱图见图 1(a, b), 由图可见, 从牛血中分离的  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  的 Raman 谱图与前人结果十分相似<sup>[16]</sup>, 其归属与前人结果比较列于表 1。

表 1 Raman 谱图峰的归属

Table 1 Assignment of the Raman Bands of  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  and its Derivative  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  (25℃, Laser Power: 80mW)

assignment	band		frequency/cm <sup>-1</sup>
	$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}^{[16]}$	$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$	$\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$
			932.0
C-C stretch	961	958.1	961.9
phe ring mode	1005	1002.4(s)	1002.9(s)
phe	1031	1031.0(s)	1029.5(s)
C-C stretch (trans)	1063		
C-C stretch	1071		1074.8(m)
C-C stretch	1096	1096.0(w)	1094.0(w)
C-C stretch (trans)	1126	1127.0(m)	1133.3(m)
phe	1172	1175.0(m)	1168.0(w)
amide III	1246	1247.0(m)	1240.0(m)
amide III (α)	1265	1277.0(m)	1267.0(m)
			1280.3(m)
amide	1286	1292.1(w)	1293.0(w)
C-H <sub>2</sub> twist	1317	1314.2(m)	1315.0(m)
C-H <sub>2</sub> twist	1341	1339.1(m)	1348.0(w)
asp, glu ν(COO <sup>-</sup> )C-H <sub>2</sub> , C-H <sub>3</sub> bend	1402	1397.1(m)	1404.8(m)
C-H <sub>2</sub> , C-H <sub>3</sub> bend	1451	1448.8(s)	1449.8(s)
amide I	1670	1669.6(s)	1671.0(s)

表 2 Raman 谱图特征峰对应的蛋白二级结构

Table 2 Raman Bands Assigned to the Secondary Structure of the Proteins, the Conditions are the Same as in Table 1

enzymes	frequency/cm <sup>-1</sup>		
	α-helix	β-structure	random coil
$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$	1277.0(m)	1669.6(s)	1669.6(s)
		1292.1(w)	1257.1(m)
$\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$	1651.7(m)	1664.8(s)	1664.8(s)
		1670.5(s)	1670.5(s)
		1230.0(m)	1239.4(m)
		1292.2(w)	

根据表 1 数据, 本工作中  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  Raman 谱峰的强度、位置与文献<sup>[16]</sup>相近。在生物大分子中, 酰胺 I 和酰胺 III 的振动频率及相对强度常用来标识蛋白的二级结构<sup>[12, 16, 19]</sup>。文献<sup>[12]</sup>指出, 在具有 α-螺旋结构的蛋白 Raman 谱图上, 其酰胺 I 的峰位于 1655cm<sup>-1</sup>, 酰胺 III 的峰位于

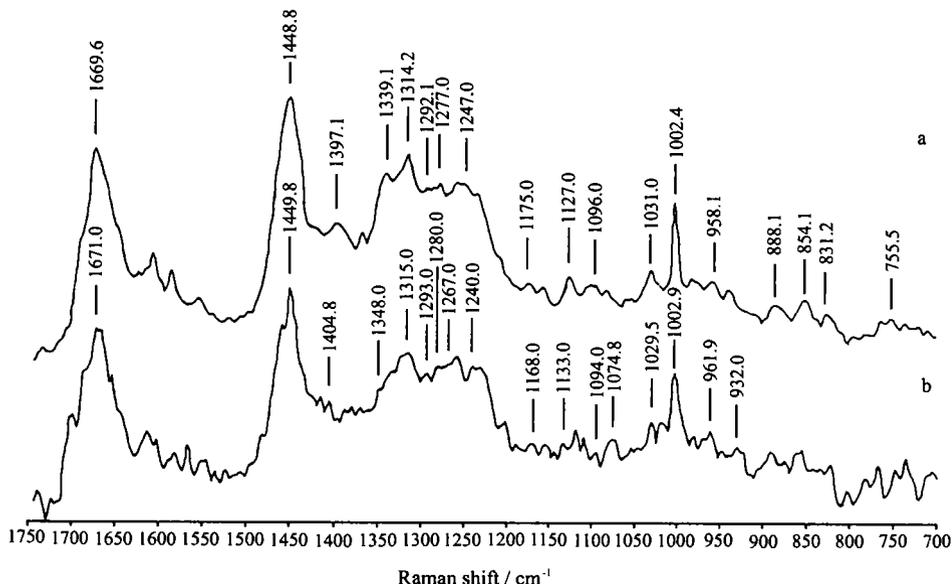


图 1 水溶液冻干粉末的 Raman 图谱

Fig. 1 Raman spectra of the proteins obtained from water solution, 25°C, laser power: 80mW

a: Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD, b: Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD

1265 ~ 1300cm<sup>-1</sup>, 均为中等强度的峰; 而 β-结构的蛋白, 酰胺 I 的峰向短波方向移动至 1665cm<sup>-1</sup> 附近, 酰胺 III 则分为两组, 一组为 1229 ~ 1235cm<sup>-1</sup> 的强峰, 另一组为 1289 ~ 1295cm<sup>-1</sup> 的弱峰; 对无序结构的蛋白而言, 酰胺 I 的峰位于 1665cm<sup>-1</sup> 附近, 与 β-结构情况相似, 酰胺 III 则在更高频率 1243 ~ 1253cm<sup>-1</sup> 区间出现中等强度的峰。对 Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 而言(图 1), 其 1669.6cm<sup>-1</sup> 的强峰可归属为 β-结构和无序结构的酰胺 I 带; 1292.1cm<sup>-1</sup> 的弱峰归为 β-结构的酰胺 III 带, 而 1257.5cm<sup>-1</sup> 中等强度的峰则是无序结构的酰胺 III 带。图中 1655 cm<sup>-1</sup> 附近无峰出现, 说明该结构中仅含较少的 α-螺旋结构<sup>[12]</sup>。同理, 我们对 Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD 的 Raman 特征峰也进行了归属, 两种 SOD 峰的归属见表 2。

Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD 的 Raman 谱中, 1650cm<sup>-1</sup> 及 1270cm<sup>-1</sup> 处出现中等强度的酰胺 I 带预示和 Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 具有不同的二级结构。

## 2.2 二级结构的定量计算

根据前人工作, 蛋白的二级结构可由下列方程组求得<sup>[12]</sup>,

$$C^{\text{protein}} I_{1240}^{\text{protein}} = f_{\alpha} I_{1240}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1240}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1240}^{\text{R}} \quad (1)$$

$$C^{\text{protein}} I_{1632}^{\text{protein}} = f_{\alpha} I_{1632}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1632}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1632}^{\text{R}} \quad (2)$$

$$C^{\text{protein}} I_{1660}^{\text{protein}} = f_{\alpha} I_{1660}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1660}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1660}^{\text{R}} \quad (3)$$

$$1.0 = f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{\text{R}} \quad (4)$$

式中:  $f_{\alpha}$ ,  $f_{\beta}$ ,  $f_{\text{R}}$  分别代表蛋白中 α-螺旋, β-结构及无序结构的含量。  $I_{\nu}^{\text{protein}}$  指蛋白在相应频率  $\nu$  处以 1448cm<sup>-1</sup> 处的强度为标准得到的相对强度。因 1448cm<sup>-1</sup> 的 Raman 峰为 -CH<sub>2</sub> 的弯曲振动, 其强度不以蛋白结构含量的变化及氧化与否而变化。  $I_{\nu}^{\alpha}$  指一个只含 α-螺旋的蛋白在  $\nu$  处的相对强度,  $I_{\nu}^{\beta}$ ,  $I_{\nu}^{\text{R}}$  的意思以此类推。通常以经修正的聚-L-赖氨酸的一套数据为标准<sup>[12]</sup> 计算蛋白的二级结构。  $I_{1240}$  是蛋白水溶液 Raman 图谱的数据, 而  $I_{1632}$ ,  $I_{1660}$  则为 D<sub>2</sub>O 中所得到的

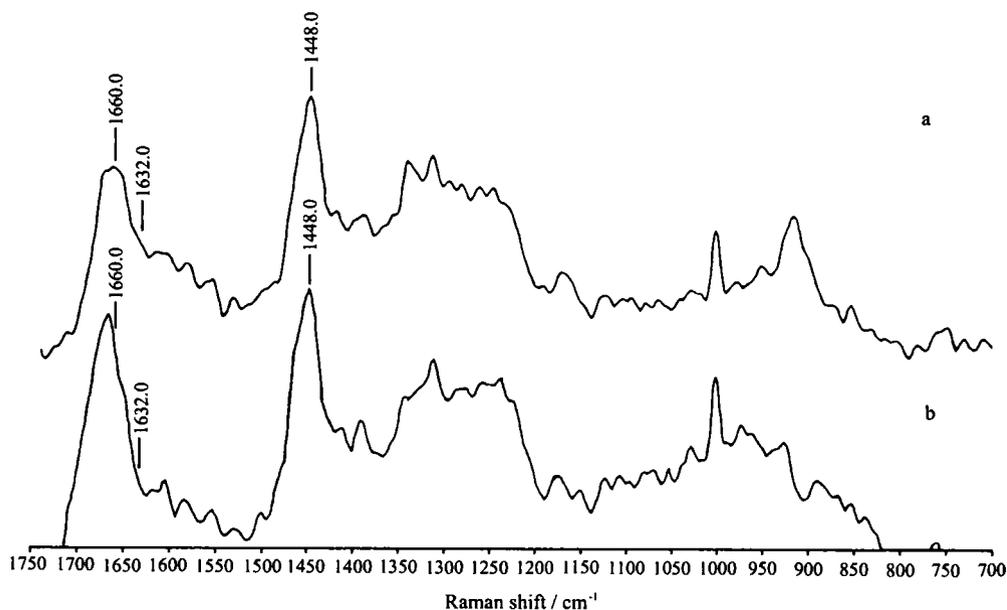


图 2 重水溶液冻干粉末的 Raman 光谱

Fig. 2 Raman spectra of the proteins obtained from D<sub>2</sub>O solution, 25°C, laser power: 80mW

a: Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD, b: Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD

数据。由于上述方程组同样适用固体<sup>[11]</sup>,故本文的  $I_{\nu}^{\text{protein}}$  分别是蛋白 SOD 在水溶液及 D<sub>2</sub>O 溶液中得到的冻干粉末的 Raman 图谱在  $\nu$  处的相对强度, (图 2(a, b)), 从图可见, phe 及 amide III 的特征峰因氘化而发生了显著的位移,与文献<sup>[13]</sup>一致。聚-L-赖氨酸的  $I_{\nu}^{\alpha}$ ,  $I_{\nu}^{\beta}$ ,  $I_{\nu}^{\text{R}}$  和实验所得的两种 SOD Raman 谱的相对强度列于表 3。

表 3 聚-L-赖氨酸的  $I_{\nu}^{\alpha}$ ,  $I_{\nu}^{\beta}$  和  $I_{\nu}^{\text{R}}$  值以及两种 SOD 的相对峰强

Table 3 Revised Standard Relative Intensities ( $I_{\nu}^{\alpha}$ ,  $I_{\nu}^{\beta}$  and  $I_{\nu}^{\text{R}}$ )<sup>[12]</sup> and those of SOD for Determination of Conformations Contents in Protein

	H <sub>2</sub> O*		D <sub>2</sub> O*	
	1240cm <sup>-1</sup>	1632cm <sup>-1</sup>	1632cm <sup>-1</sup>	1660cm <sup>-1</sup>
Cu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD	0.704	0.324		0.68
Cu <sub>2</sub> Ni <sub>2</sub> SOD	0.70	0.31		0.77
$I_{\nu}^{\alpha}$	0.00	0.80		0.55
$I_{\nu}^{\beta}$	1.20	0.72		0.88
$I_{\nu}^{\text{R}}$	0.60	0.08		0.78

(The spectral height at 1448cm<sup>-1</sup> is used as the standard, the conditions are the same as in Table 1)

\*: solid proteins obtained from water and D<sub>2</sub>O solution respectively

结合表 3 数据和方程式 1~4, 可以计算出蛋白的二级结构含量, 结果见表 4。

由表 4 可知, Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 含 3.0% 的  $\alpha$ -螺旋, 45.1% 的  $\beta$ -结构及 51.9% 的无序结构, 与 X-射线晶体结构分析<sup>[4]</sup>和傅立叶红外光谱<sup>[10]</sup>得出的结论十分相近, 说明 Raman 光谱适于测定 SOD 的二级结构, 与 Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 比较, 可以看出 Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD 的  $\beta$ -结构含量相对减少而无序结构含量增加。我们曾用光照法测定 Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD 的活性, 为 Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 活性的 40%, 说明 SOD 的活性随  $\beta$ -结构的减少, 无序结构的增加而降低, 这是由于在 SOD 中, 其每个亚基的活性中心均是  $\beta$ -折叠相互环绕而形成的一个长而深的活性通道, 铜和锌位于其中, 锌起稳定结构的作

用,而铜则主要起催化作用<sup>[4]</sup>。 $\beta$ -折叠结构的减少,可能改变了活性中心的结构,尤其是 Cu(II)周围固有的配位环境,因而使酶活性降低。

表 4 Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD 及其衍生物 Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD 的蛋白二级结构含量

Table 4 Percentages of the Secondary Structure of Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD and its Derivative Cu<sub>2</sub>Ni<sub>2</sub>SOD (%)

enzymes	methods	$\alpha$ -helix	$\beta$ -structure	random coil
Cu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD	this work	3.0	45.1	51.9
Cu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD	X-ray <sup>[4]</sup>	5	45	50
Cu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD	FTIR <sup>[10]</sup>	0	51	49
Cu <sub>2</sub> Ni <sub>2</sub> SOD	this work	8.2	27.7	64.1

### 参 考 文 献

- [1] McCord J. M., Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*(22), 6409.
- [2] Dong A., Huang P., Caughey W. S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *320*, 59.
- [3] Djinic K., Gatti G., Coda A., Antolini L., Pelosi G., Desideri A., Falconi M., Marmocchi F., Rottilio G., Bolognesi M. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *225*, 791.
- [4] Tainer J. A., Getzoff E. D., Beem K. M., Richardson J. S., Richardson D. C. *J. Mol. Bio.*, **1982**, *60*, 181.
- [5] Blundell T. L., Johnson L. N. *Proteins Crystallography*, Academic Press: New York, **1976**.
- [6] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons: New York, **1986**.
- [7] Bax A. *Ann. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 223.
- [8] Yang J. T., Wu C. C., Martinez M. *Methods Enzymol.*, **1986**, *130*, 208.
- [9] Hennessey J. P. et al *Biochemistry*, **1981**, *20*, 1085.
- [10] Sun W. Y., Fang J. L. et al *Biopolymer*, **1997**, *42*, 297.
- [11] Williams R. W. *Methods Enzymol.*, **1986**, *130*, 208.
- [12] Lippert J. L., Tyminski D., Desmeules P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 7075.
- [13] Zhao X., Wang D., Spiro T. G. *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*(21), 5414.
- [14] Wang D., Zhao X., Vargck M., Spiro T. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2193.
- [15] Zhao X., Wang D., Spiro T. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8517.
- [16] Lepork J. R., Arnlod L. D., Toorrie B. H., Andrews B., Kruuv J. *Arch. Biochem. And Biophys.*, **1985**, *241*, 243.
- [17] Qian W., Luo Q. H., Shen M. C. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1996**, *39*, 291.
- [18] Ming L. J., Valentine J. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 4426.
- [19] Chen M. L., Lord R. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 4732.

## A Study on the Secondary Structures of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and its Metal-Substituted Derivatives by Raman Spectroscopy

TANG Yin-Yan WANG Zhi-Lin YU Qing GENG Jin-Long LUO Qin-Hui\*

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

The Raman spectra of copper-zinc superoxide dismutase ( $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ ) and its metal-substituted derivative  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  were measured and the major bands were assigned. The secondary structure contents of the proteins were obtained quantitatively. The results show that the  $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  contains 3.0%  $\alpha$ -helix, 45.1%  $\beta$ -structure and 51.9% random coil, which is in agreement with the results obtained by the X-ray crystal analysis and FTIR, and the  $\text{Cu}_2\text{Ni}_2\text{SOD}$  contains 8.2%  $\alpha$ -helix, 27.2%  $\beta$ -structure and 64.1% random coil. It can be concluded that the activity of SOD decreases with the decreasing of  $\beta$ -structure and increasing of random coil.

**Keywords:** superoxide dismutase Raman spectroscopy secondary structure