

核酸酶 P1 活性中心金属离子与氯化钴(II)相互作用

郑学仿^{*1} 迟乃玉¹ 张庆芳¹ 袁玉莲¹ 李晓艳¹ 胡皆汉²⁽¹⁾ 大连大学生物工程学院, 大连 116622)⁽²⁾ 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

核酸酶 P1 是一种重要的 DNA 与 RNA 水解酶。本文利用 ICP、VIS、NMR、酶活性测定等分析方法, 首次拓展研究了核酸酶 P1 与 CoCl_2 的直接相互作用。结果发现: 核酸酶 P1 活性中心 Zn(II) 离子可被外加 CoCl_2 中的 Co(II) 部分取代, 而 Co(II) 进入酶的活性中心, 生成相应的酶衍生物“Co(II)-P1”, 并影响了酶的催化活性。与此同时还获得了 Co(II) 进入核酸酶 P1 活性中心 Zn2 位上的酶衍生物 ^1H NMR 谱。

关键词: 核酸酶 P1 CoCl_2 NMR 相互作用
分类号: O614.24*1 O627.23

核酸酶 P1 是一种多核金属含锌酶, 分子量约为 44000。能水解 RNA 或 DNA 中的磷酸二酯键, 生成 5'-核苷酸或 5'-脱氧核苷酸^[1-3]。被广泛地用来研究核酸的二级结构^[4], 是基因工程研究中的一种工具酶。现已获得其 0.28nm 分辨的活性中心的 X-射线晶体结构^[5], 其活性中心含有三个 Zn(II), 其中二个 Zn(II) 通过一个天冬氨酸 (Asp120) 和一个水分子桥连在一起, 形成一个双核中心 (Zn2, Zn3), 另一个 Zn(II) (Zn1) 分别位于距前述二 Zn(II) 为 0.47nm, 0.58nm 处 (见图 1)。所有三个 Zn(II) 在酶中均呈变形的三角双锥五配位构型。其中单核 Zn 位是酶的催化活性中心, 另双核 Zn 位为酶的辅助催化中心, 起维持结构功能作用^[6]。研究金属酶活性中心配位结构, 特别是把谱学探针 (如: 顺磁金属离子) 引入金属酶活性中心, 过去国内、外文献上主要采用重组的方法, 即先用强螯合剂 (如: EDTA 等) 把金属酶中金属离子螯合出来, 经透析后, 再用所需研究的金属进行滴定重组, 通过谱学进行结构研究^[7]。作为前文^[8]的一种拓展, 本文利用 ICP、VIS 及我们最近建立起来的研究金属酶活性中心配位结构的 NMR 实验新方法, 首次研究了核酸酶 P1 活性中心金属离子与外加 CoCl_2 的直接相互作用, 并论证了相互作用后生成的酶衍生物为只有一个 Co(II) 进入酶活性中心 Zn2 位

上所形成的酶的 Co(II) 取代衍生物, 并相应地影响了酶的催化活性, 还首次获得了其相应的 ^1H NMR 谱图。

1 实验部分

1.1 实验材料

核酸酶 P1 (EC 3.1.3.6) 来源于桔青霉。由日本

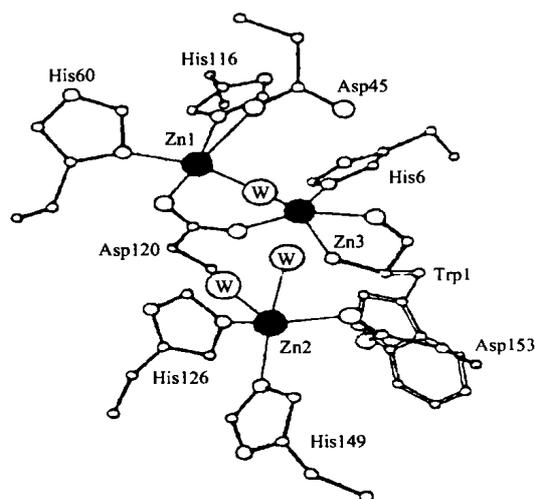


图 1 核酸酶 P1 活性中心配位结构图

Fig. 1 Structural drawing of the multi-zinc metal site of P Citrinum nuclease P1^[5], W indicates a metal coordinated water molecule.

收稿日期: 2002-11-15。收修改稿日期: 2003-01-13。

国家自然科学基金资助项目 (No. 20171009; 20271010), 大连大学学科建设发展基金资助项目 (No. XKFZ0209)。

* 通讯联系人。E-mail: zhengxuefang@263.net; Tel: 0411-7403950; Fax: 0411-7403834

第一作者: 郑学仿, 男, 38 岁, 博士, 教授; 研究方向: 生物大分子结构功能研究。

天野制药株式会社购到的 P1 酶粉, 含 50% 硅藻土。本文首先按文献^[4,6]方法对酶进行了纯化、重组, 提纯后酶活力为 $324\mu\cdot\text{mg}^{-1}$ 酶蛋白。实验所用其它化学试剂为分析纯, 所用水为二次去离子水。

1.2 实验方法与仪器

VIS 谱: 仪器为日本岛津 UV-265 型紫外可见分光光度仪。

ICP 酶中金属含量数据分析: 仪器为美国 PLA-SPECAL-II 型 ICP 光谱分析仪。ICP 测试的样品均为经相互作用, 并把溶液中游离的小分子透析出去后的制样, 故测得的均为相互作用后酶中的金属含量。

NMR 谱: 仪器为 Bruker Ac-80 型 NMR 波谱仪, 采用 $133\bar{1}$ 水峰压制脉冲序列, 数据点为 8K, 谱宽 $\text{SW} = 20000\text{Hz}$, 窗函数处理 $\text{LB} = 20\text{Hz}$, 化学位移以水峰为参考 ($\delta 4.8$)。

酶活性测定分析: 按文献^[9]进行。

1.3 样品的制备

取一定量的已纯化的核酸酶 P1 溶于 3mL $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5.6 醋酸缓冲溶液中, 分别加入不同比例量的 CoCl_2 [Co(II): P1 物质的量之比分别为 0, 1, 2, 4, 8, 12], 放置 12h 后, 4°C 下, 测得其 VIS 光谱及酶中各金属含量, 见图 2、表 1。

50mg 核酸酶 P1 溶于 0.5mL, $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.6 醋酸缓冲溶液中, 直接加入无水 CoCl_2 使之加入量的物质的量之比 Co(II): P1 = 4: 1, 混均后放入 5mm 双探头样品管中, 放置 12h 后, 室温下测其 ^1H NMR 谱, 见图 3(A)。

50mg 重组酶 (按文献^[9]方法重组获得的酶, 利用酶中金属含量 (ICP) 及酶活性数据分析等方法得知, 此重组酶为酶活性中心只含一个 Co(II) 的衍生物) 溶于 0.5mL, $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.6 醋酸缓冲

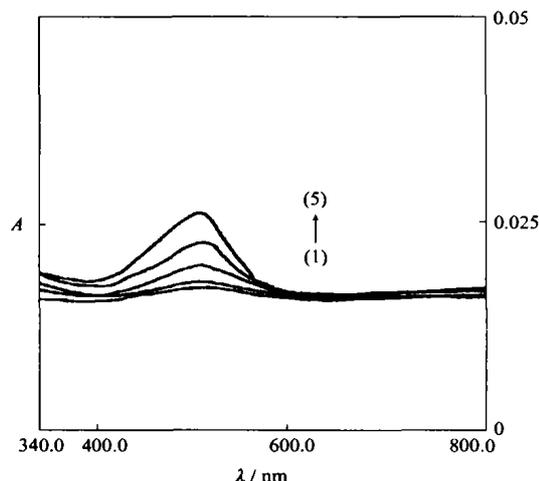


图 2 核酸酶 P1 与 CoCl_2 相互作用的可见光谱图
Fig. 2 Visible absorption spectra of nuclease P1 in $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetate buffer at pH 5.6, with various amounts of CoCl_2 added
From (1) to (5), the Co(II): P1 molar ratios are 0, 1, 2, 4, 8, respectively.
The concentration of nuclease P1 is $0.30\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

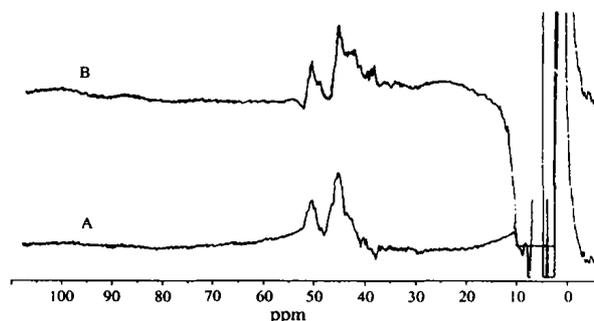


图 3 核酸酶 P1 与 CoCl_2 直接相互作用的 ^1H NMR 谱图
Fig. 3 ^1H NMR spectra of (A) nuclease P1 at 298K in H_2O with a certain amount of CoCl_2 [Co(II): P1 = 4: 1] and (B) the derivative "Co-P1" obtained by the method of reconstitution
Solutions were in $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetate buffer, pH 5.6.

表 1 核酸酶 P1 与外加 CoCl_2 间直接相互作用前后酶中金属含量、可见光谱及酶相对活性数据表

Table 1 Data of VIS and ICP of Nuclease P1 in $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Acetate Buffer at pH 5.6, with Various Amounts of CoCl_2 Added (The Concentration of Enzyme is $0.30\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Co(II): P1 molar ratio	$A_{520\text{nm}} (\times 10^{-3})$	ICP ($\times 10^{-3}\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ enzyme protein)		enzyme activity ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ enzyme)
		Zn	Co	
0	0.00	4.07	0.00	324
1	2.67	3.95	0.10	314
2	8.00	3.83	0.23	300
4	13.33	3.59	0.41	285
8	20.00	3.12	0.78	248
12	20.00	3.12	0.78	248

溶液中, 直接放入 5mm 双探头样品管中, 放置 12h 后, 室温下测其 ^1H NMR 谱, 见图 3(B)。

2 结果与讨论

2.1 酶中金属含量数据分析

在表 1 相应数据中可看出, 在核酸酶 P1 原酶中含 Zn(II)量为 $4.07(\times 10^{-3}\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 酶蛋白, 以下单位同), 在酶液中分别加入不同比例量的无水 CoCl_2 , 平衡一段时间并经透析以除去溶液中过量的小分子后, 测得酶中含 Zn(II)量随外加 CoCl_2 量的增加而下降 (从 $4.07 \sim 3.12$), 而酶中 Co(II)的含量却随之增加 (从 $0 \sim 0.78$), 此结果可说明核酸酶 P1 与外加 CoCl_2 间存在着直接相互作用, 结果使得酶中 Zn(II)部分失去, 而溶液中外加的 Co(II)进入酶中; 比较酶中 Zn(II)的丢失量与进入酶中 Co(II)的量发现, 两者大致相当, 说明外加 CoCl_2 中 Co(II)部分置换了核酸酶 P1 活性中心处 Zn(II)而进入酶中。但对于多核核酸酶 P1 来说, Co(II)进入活性中心哪一位置, 须用下列方法进一步论证。

2.2 可见光谱(VIS)分析

从图 2 及表 1 相应数据中发现, 核酸酶 P1 在加入 CoCl_2 后, 在 520nm 处有一吸收峰出现, 并且吸收峰强度随外加 CoCl_2 量的增加而增强, 由于核酸酶 P1 及外加 CoCl_2 单独在此作图条件下, 在此区域内无吸收峰出现, 与文献^[11]比较可判定此吸收峰来源于溶液中生成的“Co(II)-P1”酶衍生物中的 Co(II)的 $d-d$ 跃迁光谱吸收带。此实验结果也证实了核酸酶 P1 与外加 CoCl_2 间存在着直接相互作用, 结合 ICP 数据分析结果, 可以认为 CoCl_2 中的 Co(II)部分取代了 P1 酶活性中心 Zn(II)而进入酶活性中心处, 生成部分的核酸酶 P1 的 Co(II)取代酶衍生物, 并且此类相互作用随外加 CoCl_2 量的增加而作用愈强, 并相应使酶的活性逐渐下降 (从 $324 \sim 248\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ enzyme), 但外加 CoCl_2 到一定量 ($\text{Co(II): P1} \geq 8$) 后其 $A_{520\text{nm}}$ 和酶活性不再变化。说明在此条件下, 此类相互作用趋于平衡 (见表 1 相应数据, 由于在 $\text{Co(II): P1} \geq 8$ 后, 图 2 中谱线重合, 故在图 2 中未标出)。

2.3 核磁共振谱(NMR)分析

从图 3(A) 中可发现在低场 50ppm, 45ppm 处有二组比较强的各向同性核磁共振信号生成, 由于核酸酶 P1(酶活性中心金属离子 Zn^{2+} , d^{10} 电子态) 及 CoCl_2 单独存在下, 在此区域无信号生成, 此实验结

果可充分说明核酸酶 P1 与 CoCl_2 间存在着相互作用。相互作用后在溶液中发现有新成分生成, 生成的新成分必为酶的活性中心处引入了顺磁金属离子, 否则不会在如图 3 中低场顺磁区出现核磁共振信号^[7]。由于溶液中唯一的顺磁金属离子为 CoCl_2 中 Co(II), 因此可以判定外加 CoCl_2 中 Co(II)部分置换了核酸酶 P1 活性中心处 Zn(II)而进入酶中 Zn 位, 而生成部分“Co-P1”酶衍生物成分。把图 3(A) 与本文用重组法得到的核酸酶 P1 的 Co(II)取代酶衍生物的 ^1H NMR 谱图 (图 3(B)) 相比较发现, 两谱图中谱峰出现的条数、相应的化学位移、峰形状及相对强度等均一致, 这说明相互作用后得到的新成分与用重组法得到的 Co(II)取代的酶衍生物是同一成分, 否则其 ^1H NMR 谱图不会如此一致。分析图 3(A)、(B) 发现, 图中出现的核磁共振信号相对不是很丰富, 从核酸酶 P1 活性中心配位结构中看到 (见图 1), 酶活性中心 Zn1 位上 Zn(II)配位四个氨基酸 (His60, His116, Asp45, Asp120) 及一个水分子, 如果 Co(II)进入该位置上的话, 那么生成的酶衍生物的 ^1H NMR 谱图将会出现相当丰富的核磁共振信号, 不会如本实验图 3(A)、(B) 那样只看到简单的谱峰; 另外文献^[6]已报道了核酸酶 P1 中 Zn1 位上 Zn(II)结合的最为牢固 (相对其它二个位置上 Zn(II)), 一般不易失去此位置上 Zn(II), 所以 Co(II)进入该位的可能性可以排除。那么对于剩下两个 Zn 位, 由于此位置上 Zn(II)在溶液中结合相对松动^[10], 因此相互作用后生成的 Co(II)取代的酶衍生物中 Co(II)只能进入双核 Zn 位中的一个位置上, 比较文献中 1995 年 Ferretti 用重组法得到的一个 Co(II)进入酶中 Zn3 位后生成的酶衍生物的 ^1H NMR 谱图^[11], 发现与本实验测得的图 3(A)、(B) 有较大差异, 这说明本实验条件下得到的酶衍生物为一个 Co(II)进入酶中 Zn2 位上的核酸酶 P1 衍生物。分析酶中 Zn2 位上的 Zn(II)的配位结构可发现 (见图 1), Zn2 与二个组氨酸 (His126, His149), 二个水分子及一个天冬氨酸 Asp135 配位, 而且两个 His 均以 $N_{\epsilon 2}$ 与 Zn(II)相连, 并且 $N_{\epsilon 2}$ 与 Zn(II)之间距离及其配位环境也大致相同^[5]。这与我们已通过 NMR 论证过的枯草杆菌中性蛋白酶活性中心上 Zn(II)配位结构相类似, 得到的 ^1H NMR 谱图也类似^[12]。同样分析如果 Co(II)进入酶中 Zn2 位, 那么与 Co(II)直接配位的 His126, His149, 由于它们与 Co(II)配位环境基本相同, 因此在 ^1H NMR 谱出现的

核磁共振信号将大为减少,而形成如图 3 中出现的二组核磁共振信号,这说明谱图的分析结果与实验是互相符合的。以上实验可以充分证实在实验中多核核酸酶 P1 与外加无机 CoCl_2 间存在着直接相互作用, CoCl_2 中的 $\text{Co}(\text{II})$ 可部分置换 P1 酶中活性中心 Zn 位上 Zn (II) 而进入酶中该位,形成部分的酶的 $\text{Co}(\text{II})$ 取代衍生物。有关谱图的详细归属将在另文发表。

3 结 论

核酸酶 P1 与 CoCl_2 在水溶液中确实存在直接的相互作用,在所进行的实验条件下, $\text{Co}(\text{II})$ 进入酶的活性中心的 Zn2 位上,并相应的影响了酶的催化活性。证实了我们首次在 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 酶中发现的这类新相互作用同样存在于核酸酶 P1 中,对金属酶来说我们发现的这类新相互作用可能具有普遍的意义。此外,还首次获得了 $\text{Co}(\text{II})$ 在 Zn2 位上的酶活性中心配位结构的 ^1H NMR 谱图,对重要的核酸酶 P1 活性中心结构的研究提供了新的结构信息。

参 考 文 献

[1] Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H. *Agric. Biol. Chem.*, **1974**, **38**(4), 785.

- [2] Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H. *Agric. Biol. Chem.*, **1974**, **38**(4), 1555.
- [3] Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H. et al *Agric. Biol. Chem.*, **1974**, **38**, 2141.
- [4] Shishido K., Anlo T. In: Linn S. M., Roberts R. J. Eds. *Nuclease*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York, **1982**, p155.
- [5] Volbeda A., Lahm A., Saklyama F. et al *EMBO J.*, **1991**, **10**, 1607.
- [6] Rokugawa K., Fujimoto M., Kuninaka A. et al *Agric. Biol. Chem.*, **1980**, **44**, 1987.
- [7] Bertini I., Turano P., Vila A. J. *Chem. Rev.*, **1993**, **93**, 2833.
- [8] HU Jie-Han(胡皆汉), XU Yong-Ting(许永廷), ZHENG Xue-Fang(郑学仿) et al *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, **1997**, **42**(20), 1703.
- [9] CAI Wu-Cheng(蔡武城) *Biochemical Experimental Technology(生物化学实验技术)*, Shanghai: Fudan University Press, **1987**, p119.
- [10] Hough E., Hanson L. K., Baknes B. et al *Nature*, **1989**, **338**, 357.
- [11] Ferretti S., Luchinat C., Sola M. et al *Inorganica Chimica Acta*, **1995**, **234**, 9.
- [12] ZHENG Xue-Fang(郑学仿), HU Jie-Han(胡皆汉), XU Yong-Ting(许永廷) et al *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, **2000**, **45**(19), 1764.

Study on the Interaction of Metal Ions in Active Center of Nuclease P1 with CoCl_2

ZHENG Xue-Fang^{*1} CHI Nai-Yu¹ ZHANG Qing-Fang¹ YUAN Yu-Lian¹ LI Xiao-Yan¹ HU Jie-Han²

(¹ College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622)

(² Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

The paper using various ways, such as ICP, VIS, NMR and measurement of enzyme activity, extensively study the direct interaction of Nuclease P1 with inorganic metal compound (CoCl_2). It has been found that in aqueous solution, there exists a direct interaction between the metal ions of the active center in the metalloenzyme (Nuclease P1) and external added CoCl_2 . As a result, part of the metal ions in metalloenzyme were substituted and the corresponding metalloenzyme derivatives were produced and the catalytic activity of enzyme were changed, and the ^1H NMR spectrum of $\text{Co}(\text{II})$ -substituted nuclease P1 derivative of $\text{Co}(\text{II})$ in Zn2 site of active center was firstly obtained.

Keywords: nuclease P1 CoCl_2 NMR interaction