

Pb²⁺ 对核糖核酸酶活性及其结构的影响

洪法水^{*, a} 王 玲^b 吴 康^a 王雪峰^a

(苏州大学^a 生命科学院^b 图书馆 苏州 215006)

陶 冶

(中国科学院高能物理研究所同步辐射实验室 北京 100039)

摘要 通过各种光谱学手段研究了 Pb²⁺ 对核糖核酸酶活性的影响及其作用机制. 结果表明低浓度的 Pb²⁺ 可提高酶活性, 高浓度则严重抑制酶活性, 这是因为在高浓度下 Pb²⁺ 能完全竞争出核糖核酸酶中的 Ca²⁺. 荧光滴定显示核糖核酸酶可结合 3 个 Pb²⁺. 利用 EXAFS 表征出 Pb²⁺ 已结合到核糖核酸酶主链氨基酸残基上, 与 N 或 O 发生了配位, Pb—N(或 O) 键长分别为 0.242 nm 和 0.312 nm, 配位数均为 2. 圆二色谱测试进一步表明高浓度的 Pb²⁺ 结合使核糖核酸酶的二级结构遭到严重破坏, α -螺旋含量、 β -折叠及 β -转角大量下降, 无规则卷曲则明显增加.

关键词 核糖核酸酶, Pb²⁺, 酶活性, 配位环境, 酶结构

Effect of Pb²⁺ on RNase Activity and Its Structure

HONG, Fa-Shui^{*, a} WANG, Ling^b WU, Kang^a WANG, Xue-Feng^a

(^a College of Life Sciences, ^b Library, Suzhou University, Suzhou 215006)

TAO, Ye

(Synchrotron Radiation Laboratory, Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract Activity of RNase from porcine pancreas was enhanced by treatment with Pb²⁺ at low concentration ($0.17 \times 10^{-2} \sim 0.6 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$) but was inhibited by Pb²⁺ at high concentration (over $0.85 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$). Pb²⁺ at high concentration could competitively displace Ca²⁺ from RNase and the fluorescence titration showed that one molecule of RNase had three binding sites for Pb²⁺, the association constant k_{sv} for its low-affinity Pb²⁺-binding site was $6.03 \times 10^6 (\text{mol/L})^{-1}$. The extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectrum demonstrated that Pb²⁺ coordinated nitrogen or oxygen atoms of the active site of RNase or other amino acid residue of RNase, Pb—N (or O) bond length was 0.242 nm and 0.312 nm, and coordination number was 2, respectively. The secondary structure of RNase was greatly damaged by Pb²⁺ at high concentration resulting in the decrease of α -helix, β -sheet and β -turn contents and the increase of random coil contents.

Keywords RNase, Pb²⁺, enzyme activity, coordination environment, secondary structure

众所周知, 镉、铅、汞等是环境重金属污染中的主要元素, 游离的重金属离子进入生物体内后能与酶蛋白结合, 占据酶的活性位点, 使之失活, 导致代谢紊乱. 而核酸代谢紊乱是重金属离子“致癌、致畸变和致突变”的主要生理效应之一. 为此人们对重金属离子在生物体内的作用机制开展了广泛而深入地研究. 业已研究表明重金属离子 Cd²⁺, Pb²⁺,

Hg²⁺ 离子等对 α -淀粉酶、核酸酶等酶的活性有明显的影[1~12]. 牛胰腺核糖核酸酶 (RNase) 分子量为 13680, 由 124 个氨基酸残基的一条多肽链所构成, 活性中心结合一个 Ca²⁺. 它通过两个步骤水解 RNA, 而且还生成一个环状磷酸中间物, 重金属离子对该酶起抑制作用[13]. 我们曾利用荧光滴定方法研究表明 Cd²⁺, Pb²⁺, Ce³⁺ 能竞争性地结合到

* E-mail: Hongfshrcn@sina.com

Received April 8, 2002; revised July 16, 2002; accepted September 1, 2002.

苏州大学人才引进基金 (No. XQ316011) 资助项目.

RNase 上,一个 RNase 分子上可结合一个 Ce^{3+} ,三个 Cd^{2+} ,或三个 Pb^{2+} ,这种结合可能使酶的构象发生改变,导致酶失去活性^[14].但这种对构象的破坏还缺乏有力的实验证据.20 世纪 70 年代发展起来的扩展 X 射线吸收精细结构光谱(Extended X-ray absorption fine structure, EXAFS)是研究金属离子在生物大分子中配位环境的一种强有力工具,有关 Mo, Fe, Zn, Cd, Cu 等重金属离子在金属蛋白中的 EXAFS 研究已有诸多报道^[15~21],而圆二色(CD)谱则可以灵敏地反映出蛋白质溶液构象的变化,在蛋白质结构研究中也已得到广泛应用.但有关 Pb^{2+} 对 RNase 影响的 EXAFS, CD 谱研究国内外报道甚少,本文就这方面作些探讨,以便进一步阐明 Pb^{2+} 在生物体内的分子作用机理.

1 实验部分

1.1 仪器和材料

仪器: UV2100-紫外可见分光光度计(日本岛津),ICP-96B 型高频等离子体发生器(ICP-AES,美国产),RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津),JASCO-J-500C 圆二色谱仪(日本分光公司).

材料:猪胰核糖核酸酶,核糖核酸(均为 Sigma 公司产品), CaCl_2 , $\text{Pb}(\text{Ac})_2$,二水醋酸铀,醋酸,醋酸钠等试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 金属离子溶液的配制

用双蒸去离子水配制 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CaCl_2 , $\text{Pb}(\text{Ac})_2$,并用 HCl 和 NaOH 调节以上溶液,使其 pH 值均为 6.

1.2.2 核糖核酸酶溶液的制备

将已纯化的核糖核酸酶溶解在双蒸去离子水中,使其浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$,置于 4℃ 冰箱中备用.

1.2.3 金属离子对核糖核酸酶的激活反应

在 3 mL, 8.8 $\mu\text{mol/L}$ 的核糖核酸酶溶液中分别加入 0~10.8 $\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ (终浓度)的 Ca^{2+} , Pb^{2+} ,置于 4℃ 冰箱中作用 24 h 后,用 Kalmitsky 法测定酶活性^[22].

1.2.4 Pb^{2+} 与 Ca^{2+} 的竞争结合

在含有 Ca^{2+} 的核糖核酸酶溶液中分别加入 10.8 $\times 10^{-2}$, 13.6 $\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ (终浓度)的 Pb^{2+} ,置于 4℃ 冰箱中作用 24 h,酶液对 2 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 缓冲液透析 48 h 后,用 ICP-AES 检测酶液和缓冲液中 Ca^{2+} 含量,实验重复 3 次.

1.2.5 Pb^{2+} 与核糖核酸酶的结合数和结合常数 k_{sv} 的测定

Pb^{2+} 与核糖核酸酶的结合数和结合常数 k_{sv} 的测定采用荧光滴定法.荧光池径为 1 cm,激发和发射狭缝均为 5 nm,滤光片(EM Filter)波长 310 nm.在 3 mL, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的核糖核酸酶溶液中逐滴(5 μL)加入 1.0 mmol/L 的 Pb^{2+} 溶液,反应 3 min 后在激发波长 280 nm,发射波长 335 nm 处测核糖核酸酶与重金属离子的荧光滴定曲线. Pb^{2+} 与核糖核酸酶的结合

合常数可通过 Modified Stern-Volmer 公式^[23]确定.

1.2.6 核糖核酸酶中 Pb^{2+} 的 EXAFS 测定

核糖核酸酶中的 Pb^{2+} L3 边(13055 eV)的 EXAFS 在北京同步辐射 XAFS 站 4W1B 光束线上测量,储存环的电子能量为 2.2 GeV,单色器为平面双晶 Ge(),电流强度在 80~90 mA 之间,探测器采用充入 Ar 混合气的荧光电离室收集数据.数据分析采用英国 Daresbury 实验室开发的 EXCURV 92 软件包.

1.2.7 Pb^{2+} 竞争结合后的核糖核酸酶圆二色谱测定及二级结构计算

圆二色谱使用 JASCO-J-500C 圆二色谱仪测定,石英样品池的光程为 0.1 cm,核糖核酸酶浓度为 0.1 mg/mL.测定波长范围为 195~250 nm. CD 谱数据为三次扫描平均值.取酶的平均氨基酸残基分子量为 116, CD 强度以平均残基摩尔椭圆值[]表示,单位为 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.采用 LINCOMB 处理 CD 谱数据,以计算二级结构含量.该程序按照 Perczel 等人的方法,并进行了改进^[24].

2 结果与讨论

2.1 金属离子对核糖核酸酶活性的影响

实验研究了不同浓度的 Pb^{2+} , Ca^{2+} 对核糖核酸酶活性的影响,结果见图 1.

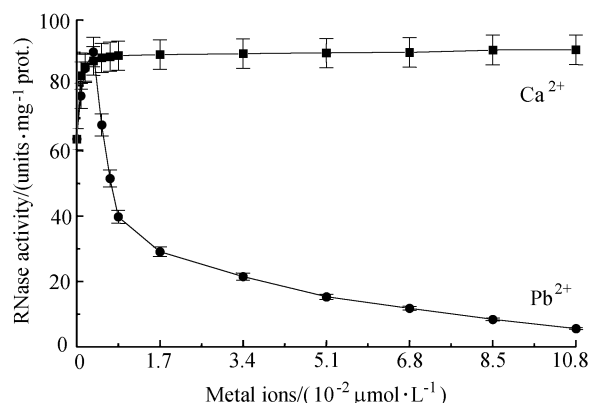


图 1 Pb^{2+} 和 Ca^{2+} 对核糖核酸酶的激活作用

Figure 1 Effect of Pb^{2+} and Ca^{2+} on activation of RNase

由图 1 看出, Pb^{2+} 在 0.17 $\times 10^{-2}$ ~0.6 $\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内,酶活性显著提高.但 Pb^{2+} 浓度超过 0.85 $\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ 时,酶活性急剧下降,表现为明显的抑制作用. Ca^{2+} 在 0.17 $\times 10^{-2}$ ~10.8 $\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,随其浓度增加,酶活性逐渐提高,尚未发生抑制现象.段昌群等^[10]研究指出, Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} 在低浓度下,随处理浓度的升高,蚕豆 DNase 和 RNase 活性相应地升高;当处理浓度超过相应浓度时, DNase 和 RNase 活性随浓度升高而降低. Bruce 等^[11]研究了稀土金属离子对葡萄球菌核酸酶活性的影响,表明高浓度稀土离子抑制该酶对核酸的裂解反应.认为稀土离子竞

争性地置换钙(),形成无效的酶- Ln^{3+} -底物复合物而抑制酶反应.

2.2 Pb^{2+} 与 Ca^{2+} 竞争结合

高浓度的 Pb^{2+} 使核糖核酸酶丧失了活性,可能是 Pb^{2+} 与核糖核酸酶中的 Ca^{2+} 发生了竞争作用,置换出 Ca^{2+} . 为了证实这种竞争作用,实验在含有 Ca^{2+} 的核糖核酸酶溶液中分别加入了 10.8×10^{-2} 、 $13.6 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 的 Pb^{2+} 溶液, Pb^{2+} 与核糖核酸酶作用后,酶中 Ca^{2+} 含量几乎接近于 0(见表 1),表明 Pb^{2+} 能完全置换出核糖核酸酶活性中心中的 Ca^{2+} .

表 1 Pb^{2+} 竞争后核糖核酸酶中 Ca^{2+} 含量

Table 1 Ca^{2+} Contents after interaction of Pb^{2+} with RNase	
$[\text{Pb}^{2+}]/(10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1})$	$[\text{Ca}^{2+}]/[\text{RNase}]$
0	1.01
10.8	0.04
13.6	0.02

2.3 Pb^{2+} 与核糖核酸酶的结合数和结合常数 k_{sv}

金属离子对酶的荧光猝灭可由动态猝灭和静态猝灭所引起. 动态猝灭为荧光生色基团处于激发态时与猝灭剂碰撞而引起的猝灭. 静态猝灭有三种情况,一种为猝灭剂与处于基态下的荧光生色基团形成非荧光化合物而导致的猝灭;一种为猝灭剂与蛋白质结合通过诱导构象变化导致生色基团周围介质极性改变而引起的猝灭;另一种为由荧光体与猝灭体之间的无辐射能量转移而引起的猝灭^[25]. 利用上述原理,通过荧光滴定法可计算出 Pb^{2+} 与核糖核酸酶的结合数和结合常数 k_{sv} . 实验表明当核糖核酸酶与 Pb^{2+} 重组后,其最大发射波长不变,但荧光强度明显下降(图略). 这是由于 Pb^{2+} 与核糖核酸酶结合后,导致酶的构象转向开放,把荧光生色团暴露在亲水环境中,或者通过 Pb^{2+} 与 Trp 残基之间的无辐射能量转移而使得核糖核酸酶的荧光被不同程度地猝灭.

用 Pb^{2+} 滴定核糖核酸酶,当逐渐滴入 Pb^{2+} 时,核糖核酸酶在 335 nm 处发射光强度呈直线下降(图 2),当 $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{核糖核酸酶}]$ 3 时, F_{335} 接近达到了最低值,此后下降十分缓慢,表明核糖核酸酶分子可与 3 个 Pb^{2+} 结合. 这说明 Pb^{2+} 不仅具有 Ca^{2+} 在核糖核酸酶中的 1 个结合位点,而且还有其它的一些结合位点. 将图 2 中的数据按 Modified Stern-Volmer 公式处理即可得到图 3,由图 3 可得 Pb^{2+} 与核糖核酸酶中的低亲和性结合位点上的结合常数 k_{sv} 为 $6.03 \times 10^6 (\text{mol/L})^{-1}$.

2.4 Pb^{2+} 在核糖核酸酶中的 EXAFS 谱

为了进一步阐明高浓度 Pb^{2+} 抑制核糖核酸酶活性的原因,本实验有选择地对低活性的核糖核酸酶进行了 EXAFS 谱的研究(图 4).

由图 4 看出,核糖核酸酶中有较强的 Pb 的 L3 边吸收边谱,表明该酶中结合有 Pb,其吸收边形状表明 Pb 为二价. 图 5 表示拟合结果,对第一壳层用 N 或 O 原子拟合得 Pb^{2+} 是与 2.4 个 N 或 O 原子配位, $\text{Pb}-\text{N}$ 或 $\text{Pb}-\text{O}$ 键长为 0.242 nm;对第二壳层也用 N 或 O 原子拟合得 Pb^{2+} 是与 1.8 个 N 或 O 原子配位, $\text{Pb}-\text{N}$ 或 $\text{Pb}-\text{O}$ 键长为 0.312 nm. 由于核糖

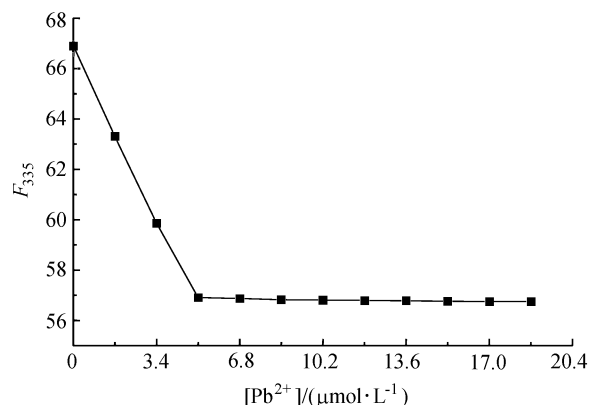


图 2 Pb^{2+} 对核糖核酸酶的荧光滴定曲线

Figure 2 Fluorescence titration curve of Pb^{2+} on RNase
[RNase] = $1.0 \mu\text{mol/L}$

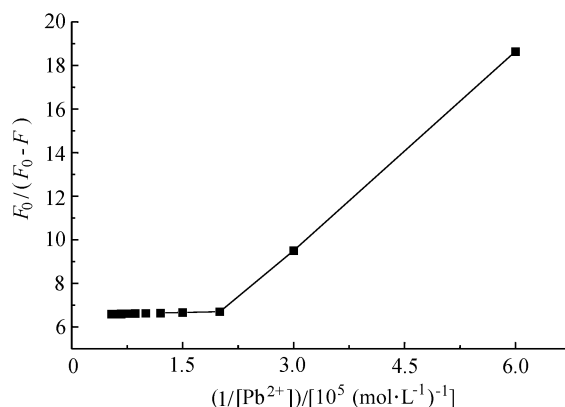


图 3 Pb^{2+} 对核糖核酸酶的荧光滴定 Modified Stern-Volmer 图

Figure 3 Modified Stern-Volmer figure of fluorescence titration of Pb^{2+} on RNase

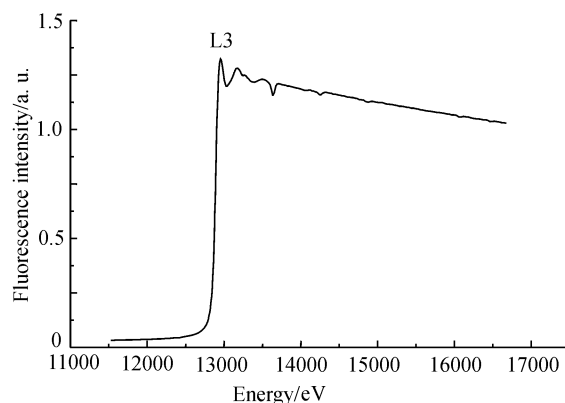


图 4 核糖核酸酶中 Pb^{2+} 的荧光扩展 X 射线吸收精细结构光谱

Figure 4 Fluorescence extended X-ray absorption fine structure spectrum of Pb^{2+} in RNase

核酸酶活性中心中有两个组氨酸残基即 His-12 和 His-119,原酶是 Ca^{2+} 结合的位点. 根据竞争实验及荧光滴定结

果, Pb^{2+} 完全取代了 Ca^{2+} , 因此我们认为 Pb^{2+} 有可能是与酶活性中心组氨酸上的 N 或 O 发生了配位, 或是与多肽链其它氨基酸残基上的 N 或 O 发生了配位, 形成无效的酶- Pb^{2+} -底物复合物, 因而使酶失去活性。

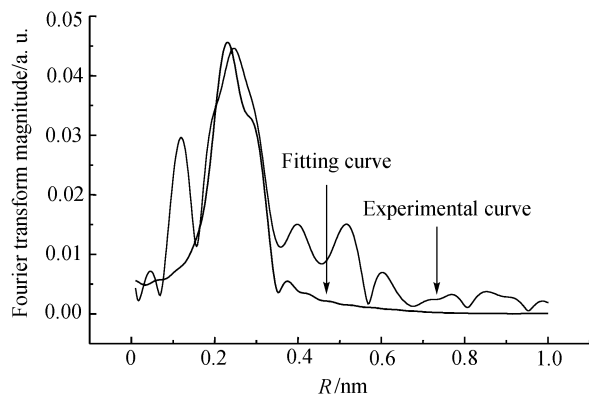


图5 核糖核酸酶中 Pb^{2+} 的径向分布函数

Figure 5 Radical distribution function of Pb^{2+} in RNase from porcine pancreas

2.5 Pb^{2+} 结合对核糖核酸酶二级结构的影响

在上述结果的基础上, 本实验选择 Pb^{2+} 结合后已丧失酶活性的核糖核酸酶进行了远紫外 CD 谱的测定, 以未加 Pb^{2+} 处理的、具高活性的酶为对照, 如图 6。由图 6 看出, 丧失酶活性的核糖核酸酶与对照的 CD 谱有明显的差异, 从 195 ~ 211 nm 处有一宽的负峰, 而对照在 209 nm 处有一强的负峰, 这与 Schellman 和 Pflumm 等人的结果相近^[26,27]。利用四种标准结构的图谱拟合后表明, 丧失酶活性的核糖核酸酶与对照相比, -螺旋含量, -折叠及 -转角分别下降了 4.5 %, 21.5 %, 19.6 %, 而无规则卷曲增加了 35.8 %。这表明高浓度 Pb^{2+} 结合到酶上后, 使酶的二级结构遭到了严重的破坏, 因而使酶失去了活性。魏欣等发现铅结合到含锌的金属硫蛋白后其二级结构也发生了明显的变化^[28]。

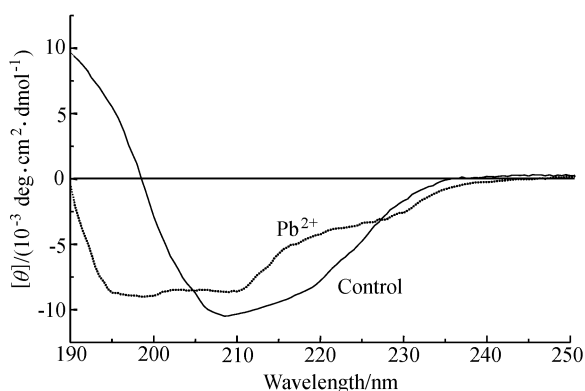


图6 Pb^{2+} 对核糖核酸酶圆二色谱的影响

Figure 6 Effect of Pb^{2+} on CD spectra of RNase

References

- Li, S.-Y.; Zhao, S.-H. *Chin. Biochem. J.* **1988**, 4(3), 210 (in Chinese).
(栗淑媛, 赵升皓, 生物化学杂志, **1988**, 4(3), 210.)
- Li, X.-M.; Ni, J.-Z.; Wang, P.-Y. *Chin. Biochem. J.* **1995**, 11(3), 281 (in Chinese).
(李新民, 倪嘉缙, 王平原, 生物化学杂志, **1995**, 11(3), 281.)
- Ma, C.-C.; Hong, F.-S.; Li, Q.-F. *Chin. J. Appl. Ecol.* **1997**, 8(1), 110 (in Chinese).
(马成仓, 洪法水, 李清芳, 应用生态学报, **1997**, 8(1), 110.)
- Ma, C.-C.; Hong, F.-S. *Acta Phytocologica Sinica* **1998**, 22(4), 373 (in Chinese).
(马成仓, 洪法水, 植物生态学报, **1998**, 22(4), 373.)
- Wu, J.-Y.; Xia, Z.-L.; Ba, Y.; Li, S.-Z. *Chin. J. Appl. Ecol.* **1991**, 2(1), 5821 (in Chinese).
(吴家燕, 夏增禄, 巴音, 李森照, 应用生态学报, **1991**, 2(1), 5821.)
- Ma, C.-C.; Hong, F.-S.; Li, Q.-F. *Oil Crops of China* **1995**, 17(2), 54 (in Chinese).
(马成仓, 洪法水, 李清芳, 中国油料, **1995**, 17(2), 54.)
- Duan, C.-Q.; Wang, H.-X. *Acta Ecologica Sinica* **1998**, 18(4), 413 (in Chinese).
(段昌群, 王焕校, 生态学报, **1998**, 18(4), 413.)
- Ni, J.-Z., *Rare Earth Bioinorganic Chemistry*, Science Press, Beijing, **1995**, p. 197 (in Chinese).
(倪嘉缙, 稀土生物无机化学, 科学出版社, 北京, **1995**, p. 197.)
- Shen, D.-Y.; Guo, S.-Q. *Bioinorganic Chemistry*, Chengdu Science and Technology University Press, Chengdu, **1993**, p. 197 (in Chinese).
(沈敦瑜, 郭顺勤, 生物无机化学, 成都科技大学出版社, 成都, **1993**, p. 197.)
- Duan, C.-Q.; Wang, H.-X.; Qu, Z.-X. *Environ. Sci.* **1992**, 13(5), 31 (in Chinese).
(段昌群, 王焕校, 曲仲湘, 环境科学, **1992**, 13(5), 31.)
- Bruce, F.; Ann, E.; Alan, N. S.; Chisnell, J. R.; Brill, W. J.; Shah, V. K. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248(16), 5821.
- Hong, F.-S.; Wang, X.-F.; Shen, S.-D.; Su, G.-X.; Pan, X.-F. *Progress in Biochemistry and Biophysics* **2002**, 29(1), 74 (in Chinese).
(洪法水, 王雪峰, 沈颂东, 苏国兴, 潘新法, 生物化学与生物物理进展, **2002**, 29(1), 74.)
- Alan, F., *Structure and Mechanism of Enzyme*, Translated by Du, J.-Z.; Ru, B.-G.; Wei, X.-C., Peking University Press, Beijing, **1991**, p. 457 (in Chinese).
(Alan, F. 著, 酶的结构和作用机制, 杜锦珠, 茹炳根, 卫新成译, 北京大学出版社, 北京, **1991**, p. 457.)

- 14 Hong, F.-S. ; Wang, X.-F. ; Shen, S.-D. ; Su, G.-X. ; Pan, X.-F. *Spectroscopy and Spectral Analysis* **2002**, 22 (4), 65 (in Chinese).
(洪法水, 王雪峰, 沈颂东, 苏国兴, 潘新法, 光谱学与光谱分析, **2002**, 22(4), 65.)
- 15 Cramer, S. P. ; Gillum, W. O. ; Hodgson, K. O. ; Mortenson, L. E. ; Stiefel, E. I. ; Chisnell, J. R. ; Brill, W. J. ; Shah, V. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100(12), 3814.
- 16 Teo, B. K. ; Shulman, R. G. ; Brown, G. S. ; Meixner, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101(19), 5624.
- 17 Garner, C. D. ; Hasnain, S. S. ; Bremner, I. ; Bordas, J. J. *Inorg. Biochem.* **1982**, 16, 253.
- 18 Phillips, J. C. ; Bordas, J. ; Foote, A. M. ; Koch, H. J. ; Moody, M. F. *Biochemistry* **1982**, 21, 830.
- 19 Abrahams, I. L. ; Garner, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4596.
- 20 Abrahams, I. L. ; Bremner, I. ; Diakun, G. P. ; Garner, C. D. ; Hasnain, S. S. ; Ross, I. ; Vasak, M. *Biochem. J.* **1986**, 236, 585.
- 21 Peariso, K. ; Zhou, Z.-S. ; Smith, A. E. ; Matthews, R. G. ; Penner-Hahn, J. E. *Biochemistry* **2001**, 40, 987.
- 22 Kalnitzky, G. ; Hummel, J. P. ; Dierks, C. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, S.1512.
- 23 Prasad, A. R. S. ; Richard, F. L. ; Paul, M. H. *Biochemistry* **1973**, 12(18), 3489.
- 24 Perczel, A. ; Park, K. ; Fasman, G. D. *Anal. Biochem.* **1992**, 203, 83.
- 25 *Fluorescence Analytical Method*, Eds. : Chen, G.-Z. ; Huang, X.-Z. ; Zheng, Z.-Z., Science Press, Beijing, **1990**, p. 1 (in Chinese).
(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓编著, 荧光分析法, 科学出版社, 北京, **1990**, p. 1.)
- 26 Schellman, J. A. ; Lowe, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 1070.
- 27 Plumm, M. N. ; Beychok, S. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244(14), 3973.
- 28 Wei, X. ; Ru, B.-G. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 15(2), 289 (in Chinese).
(魏欣, 茹炳根, 中国生物化学与分子生物学报, **1999**, 15(2), 289.)

(A0204089 CHENG, B.)