

4 Shiro Y, Fujii M, Iizuka T *et al.* Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P-450nor with nitric oxide. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 1617~ 1623

5 Nakahara K, Shoun H, Adachi S *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of nitric oxide reductase cytochrome P-450nor from *Fusarium oxysporum*. *J Mol Biol*, 1994, **239**: 158~ 159

6 Tomura D, Obika K, Fukamizu A *et al.* Nitric oxide reductase cytochrome P-450 gene, CYP 55, of the fungus *Fusarium oxysporum* containing a potential binding-site for FNR, the transcription factor involved in the regulation of anaerobic growth of *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1994, **116**: 88~ 94

7 Obika K, Tomura D, Fukamizu A *et al.* Expression of the fungal cytochrome P-450nor cDNA in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm*, 1993, **196**: 1255~ 1260

8 Kizawa H, Tomura D, Oda M *et al.* Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 10632~ 10637

9 Usuda K, Toritsuca N, Matsuo Y *et al.* Denitrification by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*: Anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450nor. *Appl Envir Microbiol*, 1995, **61**: 883~ 889

10 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~ 275

Study on the Properties about Recombinant *Fusarium oxysporum* Cytochrome P-450nor.
LIU Deli (*Department of Biology, Huazhong*

Normal University, Wuhan 430070, China); Hirofumi Shoun (*Department of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Japan*).

Abstract Purified recombinant *Fusarium oxysporum* cytochrome P-450nor (rF•P-450nor) was used for spectroscopic and kinetic studies. K_m and V_{max} were determined. K_m (NO) and K_m (NADH) were 0.128 mmol/L and 0.208 mmol/L respectively. V_{max} for N₂O was 11 363 min⁻¹. The spectroscopic study indicated that: rF•P-450nor has the typical characteristics of a heme protein, and has the maximum absorbance at 413 nm. After added Na₂S₂O₄, the maximum absorption peak was moved to 405 nm. After added CO and Na₂S₂O₄, the absorption peak was at 450 nm. When combined with NO, the absorption peak was moved to 430 nm. These spectrum characteristics were the same as those of the native F•P-450nor.

Key words cytochrome P-450nor, kinetic study, spectrum absorbance, nitric oxide reductase

博莱霉素-Ce (III) 对 DNA 的切断机理初探*

黄德盈¹⁾ 杨 铭²⁾ 王 夔

(北京医科大学天然药物和仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 根据外切核酸酶 III 酶解博莱霉素-Ce (III) [BLMA5-Ce (III)] 作用过的双链直线型 DNA 时, 酶解速率明显增大, 酶解产物除 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTMP 4 种单核苷酸外, 还有其他成分存在的实验事实, 推测出 BLMA5-Ce (III) 在 DNA 双链的特定部位沿 5'→3' 的方向切断磷酸二酯键, 使 DNA 的双链上形成多个暴露的 3'-OH 末端。

关键词 脱氧核糖核酸, 博莱霉素 A5, 铈 (III), 外切核酸酶 III

* 国家自然科学基金资助课题。 ¹⁾ 客座研究人员 (中南民族学院化学系, 武汉 430074)。
²⁾ 通讯联系人 (北京医科大学 261 信箱, 北京 100083)。 收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-07-29

1966 年 Wumezawa 从放线菌中提取得到的博来霉素 (Boleomycin, BLM) 已被广泛用于治疗皮肤癌、子宫颈癌、恶性淋巴瘤等。在研究其抗癌机理时发现 BLM 杀死癌细胞需 $\text{Fe}(\text{II})$ 和氧分子作辅基。1985 年 Sugiura^[1] 报道了 BLM 分子中的噻唑基团能识别双螺旋 DNA 小沟区富 5'-GC 的部位, 并在此部位与 DNA 结合, 而分子中的 β -氨基丙酸-嘧啶- β -羟基氨基酸分别提供 N 原子与 $\text{Fe}(\text{II})$ 形成

BLM- $\text{Fe}(\text{II})$ 配合物 (图 1), 通过 $\text{Fe}(\text{II})$ 与 O_2 的电子传递, 形成氧自由基, 其攻击 DNA 链上 G 碱基核苷上脱氧核糖 C_4 的氢原子而切断 DNA 的抗癌机理。此后, 过渡族元素的离子如: $\text{Co}(\text{II})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Ni}(\text{II})$ 等和 BLM 的配合物与 DNA 的作用机理研究已有许多报道^[2~6]。发现 BLM 与 $\text{Ce}(\text{III})$ 结合后, 对 DNA 有高的特异切断活性, 但对其作用机理未作深入研究。

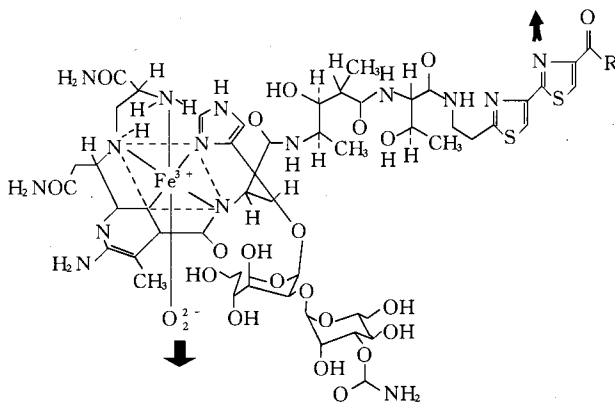


图 1 BLM- $\text{Fe}(\text{II})$ 配合物的结构

喜谷喜德等^[7]曾采用 HPLC 测定经顺铂配合物作用后的寡聚核苷酸和小牛胸腺 DNA 用碱性磷酸酶、蛇毒磷酸酶酶解的产物, 证明了顺铂配合物是与 DNA 的 G 碱基相结合。

外切核酸酶 III (exonuclease III) 催化双链及带缺口的环状 DNA 的 3'-羟基端逐一去除单核苷酸的反应, 反应双向进行, 最终产物为 5'-dNMP^[8]。我们设想用两端均为 3'-OH 末端的直线型双链 DNA 与 BLM- $\text{Ce}(\text{III})$ 作用后作为底物, 若外切核酸酶的活性及酶解产物发生变化, 则可得到 BLM- $\text{Ce}(\text{III})$ 对 DNA 结构影响的间接证据, 由此可推测其与 DNA 作用的机理。

本研究用琼脂糖电泳测定外切核酸酶 III 酶解 DNA 时不同时刻剩余 DNA 片段的大小, 了解经 BLM- $\text{Ce}(\text{III})$ 作用过的线型 pBR322 DNA 被外切核酸酶 III 酶解速率的变化; 用 HPLC 测定酶解产物的变化, 由此推论 BLM-

$\text{Ce}(\text{III})$ 配合物在某些特定的部位沿 5'→3' 的方向切断 DNA 的磷酸二酯键, 暴露出 3'-OH 末端的结论。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验方法

1.1.1 双链直线型 DNA 的制备: 具有 3'-OH 末端的双链直线型 DNA, 是用 EcoR V 酶解 pBR322 后所得到的。于 0.5 ml 塑料离心管中加入 1 g/L 的 pBR322 25 μl , 10×EcoR V 缓冲液 20 μl , EcoR V (10 U/ μl) 8 μl , 补加无菌二次蒸馏水至总体积为 200 μl , 混匀后于 37℃ 下反应至琼脂糖电泳表明全部 pBR322 都变为直线型后, 用常规的酚萃取法除去蛋白质, 于 -20℃ 乙醇沉淀核酸, 除去沉淀剂后, 加入外切核酸酶 III 缓冲液, 分装为 10 μl 或 20 μl , 于 -20℃ 下保存备用。用上述方法得到两端都有 3'-OH 末端 4 362 bp 的直线双链 DNA。

1.1.2 BLM A5-Ce (III) 与 DNA 的作用: 于 0.5 ml 离心管中加入 10 mmol/L 的 BLM A5 溶液 1 μ l, 10 mmol/L 的 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 μ l, 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 4 μ l, 用无菌二次蒸馏水稀释至总体积为 100 μ l, 于 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 h, 得到浓度 0.1 mmol/L 的 BLM A5-Ce (III) 配合物溶液. 上述得到的直链 pBR322 与 0.1 mmol/L 的 BLM A5-Ce (III) 1:1 混合后, 在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 体系中, 于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min 后直接作为底物, 或用 -20 $^\circ\text{C}$ 无水乙醇沉淀得到的 DNA 作底物, 进行外切核酸酶 III 酶解反应.

1.1.3 外切核酸酶 III 酶解直线型双链的活性测定: 外切核酸酶 III 活性的测定借用了 DNA 测序时形成嵌套缺失突变体的方法^[9]. 即于不同时间取一定量在 37 $^\circ\text{C}$ 下温育的外切核酸酶 III 与底物的混合液加入到冷冻的绿豆芽酶体系中, 终止反应并切断反应形成的单链 DNA, 得到在不同时间未被酶解的双链 DNA 片段, 用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 比较其泳动距离即可知酶解速率的差异. 于数个 0.5 ml 离心管中各加入 7.5 ml 绿豆芽酶混合液 (由 2 μ l 绿豆芽酶 (35 U/ μ l), 10 μ l 10 $\times$ 绿豆芽酶缓冲液, 58 μ l 无菌二次蒸馏水配成), 置于冰水中. 另取一 0.5 ml 离心管, 加入上述制得的直线型双链 DNA (经或未经 BLM A5-Ce (III) 处理过的) 10 μ l, 10 $\times$ 外切核酸酶缓冲液 1 μ l, 和 9 μ l 无菌二次蒸馏水, 制成底物混合液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 温育 5 min 后, 取出 2.5 μ l 加入一份冷冻的绿豆芽酶混合液中, 剩余的底物混和液中加入 2 μ l 浓度为 180 U/ μ l 的外切核酸酶 III, 立即混匀, 温育, 每隔 1 min 取出 2.5 μ l 置于一份冷冻的绿豆芽酶混液中. 全部底物加完后, 再在 37 $^\circ\text{C}$ 下, 使绿豆芽酶除去单链 DNA, 30 min 后加入反应停止液停止反应, 在 70 $^\circ\text{C}$ 下加热 10 min 使酶灭活. 各反应混合液加入 5 μ l 溴酚蓝, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳.

1.1.4 外切核酸酶 III 酶解产物的分析: 用高

效液相色谱 (HPLC) 分离、测定外切核酸酶 III 的酶解产物. 为了使酶解得到的各种单核苷酸达到可检出的浓度, 底物的绝对量应大于 1 μ g, 故实验中用 5 μ l 上述制备得到的直线型双链 DNA (经或未经 BLM A5-Ce (III) 处理过的), 与 3 μ l 外切核酸酶 III (90 U/ μ l) 混合后, 于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 48 h, 使底物彻底酶解. 色谱条件为色谱柱: C18 反相柱 (0.46 cm $\times$ 25 cm), 流动相: 20 mmol/L KH_2PO_4 缓冲液 (pH 5.6), 流速: 1.2 ml/min, 检测: 254 nm 吸收.

1.2 实验材料

质粒 pBR322、EcoR V、外切核酸酶 III 和绿豆芽酶为华美生物工程公司制品; 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTTP 及琼脂糖凝胶, 溴乙锭为 Sigma 公司制品, 其余的苯酚、三氯甲烷、三羟基氨基甲烷、磷酸二氢钾和氯化锌等均为市售的分析纯或优级纯.

2 结果与讨论

2.1 BLM A5-Ce (III) 对酶解速率的影响

外切核酸酶 III 酶解直线型双链 DNA 的活性测定结果 (图 2) 表明 C_1 、 C_2 的泳带较对应的 A、B、D 泳带距离大得多, 表明在相同的反应

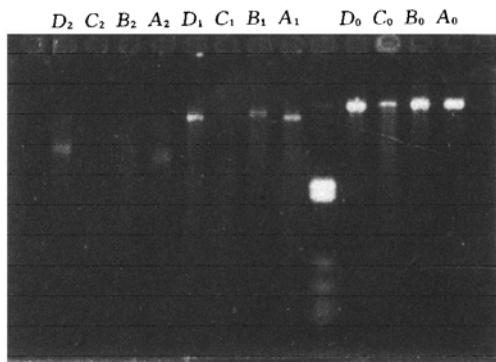
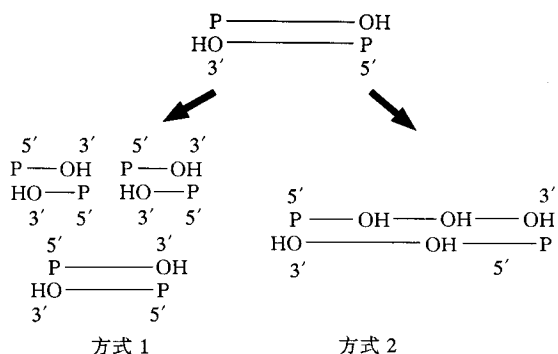


图 2 BLM-Ce (III) 对外切核酸酶 III 活性的影响
A₀: 不加外切核酸酶 III 的 Ce (III); B₀: 不加外切核酸酶 III 的 BLM; C₀: 不加外切核酸酶 III 的 BLM-Ce (III); D₀: 不加外切核酸酶的对照. A₁、B₁、C₁、D₁ 和 A₂、B₂、C₂、D₂ 分别为反应 1 min 和 2 min Ce (III)、BLM、BLM-Ce (III) 和对照.

时间里, 经 BLM-Ce (Ⅲ) 作用过的 DNA 被外切核酸酶Ⅲ除去的单核苷酸多, 余下的片段小, 即酶解反应的速率增大。

根据外切核酸酶Ⅲ对底物的要求, 不难推测酶解速率的增加是由于经 BLM A5-Ce (Ⅲ) 作用后的 DNA 有更多的 3'-OH 存在。我们认为直线双链 DNA 的 3'-OH 末端可通过以下两种方式而产生。



方式 1 如同某些能使 DNA 产生平端切点的限制性内切酶一样, 将 DNA 被内切为数个大小不一, 末端为 3'-OH 的片段; 而方式 2 则是在整条 DNA 链上产生多个暴露的 3'-OH 末端。显然, 若以方式 1 产生多个 3'-OH, 则酶解反应的最终产物应只有 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTTP 4 种单核苷酸。若以方式 2 进行, 则最终产物除了 4 种单核苷酸外, 还会有其他的产物存在。因此通过分析外切核酸酶Ⅲ酶解的终产物, 可判断 DNA 链上 3'-OH 产生的方式, 继而得到 BLM-Ce (Ⅲ) 对 DNA 双链结构影响的有关信息。

显然, 如果 BLM-Ce (Ⅲ) 对外切核酸酶Ⅲ有协同作用也会表现出酶活性增加, 为了验证这种情况是否存在, 我们用乙醇沉淀出经 BLM-Ce (Ⅲ) 作用过的直线型 pBR322 DNA 作底物重复上述实验, 仍表现出外切核酸酶Ⅲ活性增加。由此, 证实确系底物结构的变化, 而导致外切核酸酶Ⅲ活性的增加。

2.2 外切核酸酶Ⅲ酶解产物的解析

图 3a 为标准 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTTP 单核苷酸 (0.25 $\mu\text{mol/L}$)

混合液的色谱图; 图 3b 为未经 BLM-Ce (Ⅲ) 作用的 DNA 作底物时, 外切核酸酶Ⅲ的最终酶解产物的色谱图; 图 3c、d 分别为经 BLM-Ce (Ⅲ) 和经 BLM-Fe (Ⅱ) 作用的 DNA 作底物时, 外切核酸酶Ⅲ的最终酶解产物的色谱图; 图 3e、f 分别为 BLM-Ce (Ⅲ) 和直链 pBR322 DNA 的色谱图。

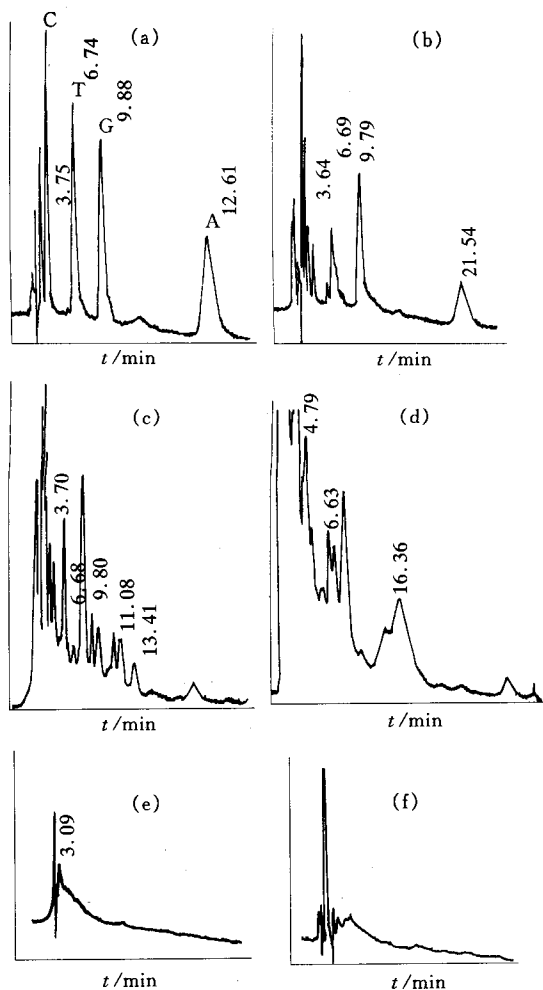


图 3 外切核酸酶Ⅲ酶解产物的色谱图

比较图 3a 和 b 可见色谱图上的四个单核苷酸的峰一一对应, 说明在本实验条件下, 酶解反应充分进行。然而, 图 3c 除了可见 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTTP 4 个峰外, 还有未知成分的新峰产生, 从而排除了 BLM-Ce (Ⅲ) 对 DNA 的作用以方式 1 产生

3'-OH 可能性.

因此, 我们推测 BLM A₅-Ce (III) 对 DNA 作用时, 有一端结合在 DNA 链的某些部位上, 并沿 5' → 3' 方向切断 DNA 的磷酸二酯键产生暴露的 3'-OH 末端, 即以方式 2 作用于 DNA. 这样, 当外切核酸酶 III 催化从 DNA 的 3'-OH 末端逐个去除单核苷酸时, 可从多个起点开始, 酶解速度增加, 但当酶解至结合有 BLM-Ce (III) 的部位时而终止, 所以反应最终结果除 4 种单核苷酸外, 还会有其他的产物存在. 图 3c 中所出现的保留时间为 7.56 min, 11.13 min 的未知成分的峰既不是 BLM A₅-Ce (III) 的, 也不是直链 pBR322 DNA 的峰 (见图 3e、f), 我们认为这很可能是 BLM-Ce (III) 与 DNA 结合的产物. 在序言中曾经提到过 Sugiura 在研究 BLM-Fe (II) 对 DNA 的作用机理时, 业已证明 BLM 分子的噻唑基一端能结合在 DNA 双链富 5'-GC 的小沟区上. 我们的推论与其一致.

因此, BLM-Ce (III) 与 DNA 作用的机理被认为是在特定部位沿 5' ~ 3' 的方向切断双链 DNA 的磷酸二酯键, 形成多个暴露的 3'-OH 末端. 至于其究竟如何切断 DNA? 在哪些部位与 DNA 相作用则是我们下一步研究的课题.

参 考 文 献

- 1 Sugiura Y, Takita T, Umeezawa H. Bleomycin antibiotics: Metal complexes and their biological action. In: Sigel H eds. metal ions in biological systems, 19. New York: Dekker, 1985: 81~ 108
- 2 Kuwahara J, Sugiura Y. Sequence-specific recognition and cleavage of DNA by metalbleomycin: minor groove binding and possible interaction mode, *Biochemistry*, 1988, **85** (8): 2459~ 2463
- 3 Chang C H, Meares C F. Cobalt-bleomycin and deoxyribonucleic acid: Sequence dependent interactions, action spectrum for nicking and indifference to oxygen. *Biochemistry*,

1984, **23** (10): 2268~ 2274

- 4 Takashi M, Isao S, Matsuura T. New lumibleomycin containing thiazolylisothiazole ring. *J Am Chem Soc*, 1987, **109** (3): 938~ 939
- 5 Kuwahara J, Guan L, Sugiura Y. Binding and cleavage characteristics of DNA by bleomycin vanadium complex. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ*, 1991, **69** (5~ 6): 511~ 519
- 6 Guan L, Totsuka R, Kuwahara J. Cleavage of yeast tRNA^{phe} with Ni (III) and Co (III) complexes of bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **191** (3): 1338~ 1346
- 7 稻垣健治, 喜谷喜德. 抗がん性白金錯体のオリゴヌクレオチドおよび DNA の結合について. 见: 田中久主编. 第二回金属の関与する生体関連反応 シンポジウム講演要旨集. 京都: 社団法人日本药学会, 1984, 62~ 64
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 293~ 295
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 626~ 628

Study on DNA Cleaving Mechanism by Bleomycin A₅-Ce (III). HUANG Deying, YANG Ming, WANG Kui (*National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Digestion rate markedly increased as exonuclease III digesting linear DNA with double chains which had reacted with Bleomycin A₅-Ce (III) [BLMA₅-Ce (III)]. In addition, there were other products to the four mononucleotides (5-dAMP, 5-dTMP, 5-dCMP, 5-dGMP). It is suggested that BLMA₅-Ce (III) cleaves phosphoaryl diester bonds along the direction of 5' ~ 3' at specific sides of double-chain DNA forming more exposed 3'-OH ends.

Key words DNA, BleomycinA₅, Ce (III), exonuclease III