

研究快报

超氧化物歧化酶切割超螺旋 DNA 的活性*

凌 俊 阮康成 刘望夷¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 在体外系统中, 发现超氧化物歧化酶 (SOD) 具有切割超螺旋 DNA 的活性. 猪血和牛血 Cu/Zn-SOD 以及烟草 Mn-SOD 都能将超螺旋 DNA 转变为非超螺旋结构的缺刻环状 DNA, 进一步产生线状 DNA. 它们只作用于超螺旋 DNA 而不作用于线状 DNA. 这个事实排除了 SOD 样品中污染核酸酶的可能性. 用 H₂O₂、胍基抑制或蛋白酶降解的实验结果表明, 这两种酶的活性中心处于酶蛋白的不同部位.

关键词 猪血 Cu/Zn-SOD, 牛血 Cu/Zn-SOD, 烟草 Mn-SOD, 超螺旋 DNA 切割活性

超氧化物歧化酶 (EC 1.15.1.1) 广泛分布于需氧生物中, 在减少超氧化物负离子 O₂⁻ 对细胞的损害方面起着重要的作用. 一般认为是机体抵抗氧自由基的第一道防线, O₂⁻ 可切断 DNA, 而 SOD 就是通过淬灭 O₂⁻ 从而保护了细胞中的 DNA.

核糖体失活蛋白 (RIP) 具有切割超螺旋 DNA 成缺刻 (nicked) 环状 DNA 和线状 DNA 的活性, 它们只作用于超螺旋 DNA 而不作用于线状 DNA^[1~3]. 我们从香樟 (*Cinnamomum camphora*) 种子中纯化出两种核糖体失活蛋白——辛纳毒蛋白 (cinnamomin) 和克木毒蛋白 (camphorin), 发现它们也具有切割超螺旋 DNA 的活性^[2]. 接着, 在测定 camphorin 的 N 端氨基酸序列时, 发现其 N 端 26 个氨基酸的序列与烟草 Mn-SOD 的 N 端十分相似 (88%). 实验表明, camphorin 也具有 SOD 的活性^[4]. 进一步的实验证明, 在还原剂存在下, 烟草 Mn-SOD 也具有切割超螺旋 DNA 的活性. 另外, 两个来自动物的 SOD——猪血 Cu/Zn-SOD 和牛血 Cu/Zn-SOD 也具有这种活性. 与核糖体失活蛋白 camphorin 相比, 猪血和牛血 Cu/Zn-SOD 的活性比较低, 而植物来源的烟草 Mn-SOD 要 10 倍的量才能达到相应

的活性. 虽然 SOD 切割超螺旋 DNA 的活性相对较低, 但它们确实具有切割超螺旋 DNA 的活性. 而且, 它们与核糖体失活蛋白一样, 加大量的 SOD 也不作用于线状结构的 DNA. 这是一个排除 SOD 样品中污染其他核酸酶的强有力的证据. 由此, SOD 也可看作是一类特异的依赖于超螺旋结构的内切核酸酶.

由于 Cu/Zn-SOD 对 H₂O₂ 或胍比较敏感, 猪血 Cu/Zn-SOD 被 H₂O₂ 或胍失活后, 丧失了其歧化 O₂⁻ 的活性, 然而它的切割超螺旋 DNA 的活性不仅没有丧失, 还有一定程度的增加. 由于有抗氧化剂的存在, 可以排除 O₂⁻ 直接攻击超螺旋 DNA 的可能性. 另外, 由于 SOD 的结构比较稳定, 对蛋白酶的酶解不很敏感, 实验证明, 在有 0.1% SDS 存在的情况下, 加入几种蛋白水解酶的混合液, 延长反应时间, 并不断地补加蛋白水解酶混合液, 由此而产生的一些猪血 Cu/Zn-SOD 的酶解肽段仍然具有 SOD 活性, 但其切割超螺旋 DNA 的活性却完全消失了. 由此可以说明, SOD 切割超螺旋 DNA 的活性部位与它歧化 O₂⁻ 的活性部

* 国家自然科学基金和中国科学院基金资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-11-25, 修回日期: 1997-01-19

位是不同的。它不需要金属离子的存在。

参 考 文 献

- 1 Li M X, Yeung H W, Pan L P *et al.* Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro*. Nucleic Acid Res, 1991, **19** (22): 6309~ 6312
- 2 Ling J, Liu W Y, Wang T P. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome inactivating proteins *in vitro*. FEBS Lett, 1994, **345** (2): 143~ 146
- 3 Roncuzzi L, Gasperi Campani A. DNA-nuclease activity of single chain ribosome inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin. FEBS Lett, 1996, **392** (1): 16~ 20
- 4 Liu W Y, Chen H Y, Ling J *et al.* Three different enzymatic activities of a ribosome inactivating protein purified from the seed of *Cinnamomum camphora*. In: Abstract Book: Frontiers in translation, an international conference on the structure and function of the ribosome. Canada: Victoria Conference Center, Victoria B C, 1995, 147

Activity of Superoxide Dismutase on Cleaving Supercoiled Double Stranded DNA. LING Jun,

RUAN Kangcheng, LIU Wangyi (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

Abstract Several superoxide dismutases (SODs), such as porcine and bovine erythrocyte Cu/Zn-SODs and *N. tabacum* Mn-SOD, were found to exhibit the activity to cleave supercoiled DNA *in vitro*. They converted supercoiled DNA into nicked and further into linear form. They did not act on linear double-stranded DNA. Activity assays after they were inactivated by H₂O₂ or guanidine and hydrolyzed by proteases suggested that these two activities of dismuting O₂⁻ and cleaving supercoiled DNA involved in different sites in SODs.

Key words porcine erythrocyte Cu/Zn-SOD, bovine erythrocyte Cu/Zn-SOD, *N. tabacum* Mn-SOD, supercoiled DNA-cleaving activity

五步蛇蛇毒类凝血酶 N 端的部分氨基酸序列

杜晓燕 朱 洪 蒋克贤¹⁾ 俞鹤年 周元聪

(中国科学院生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 从五步蛇蛇毒中纯化得到的类凝血酶, 在 SDS-PAGE 及 IEF 均为一条带, 且分子质量约 38 ku, 等电点约为 4.0。测定该酶 N 端 15 个氨基酸的序列是 VIGGVECDINEHRFL, 与其他的蛇毒类凝血酶有高度同源性。

关键词 五步蛇, 类凝血酶, N 端, 序列

蛇毒中的类凝血酶, 在体外引起血浆纤维蛋白原的凝聚, 起凝血作用; 但在体内因它不激活凝血因子 XIII, 所以由它水解而生成的纤维蛋白凝块, 没有侧链交联, 容易被纤维蛋白溶酶降解, 造成体内纤维蛋白原浓度降低而表现为抗凝效应^[1]。在临床上蛇毒类凝血酶已成为防治血栓栓塞性疾病的有效药物, 国外已有商品生产, 如 Ancrod, Batroxobin 等, 据统计至今为止已注册作为诊断和药用的有 7 个纯酶。

我们从江西产五步蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒中分离得到纯的类凝血酶, 本文主要报道用 Edman 降解法在 PE 491 Protein Sequencer 中测定的该类凝血酶 N 端 15 个氨基

酸的序列。

1 五步蛇蛇毒类凝血酶的制备

五步蛇蛇毒经过 DEAE-Sepharose CL-6B 后, 收集具有精氨酸酯酶活力及凝血活力的部分, 依次再上 FPLC 的 Superose 12 柱及 Mono Q 柱, 得到了如图 1 所示对称的层析峰, 主峰面积大于 98%。此样品经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 分子质量约为 38 ku。等电聚焦的结果也是一条带, 等电点约为 4.0。

¹⁾ 进修人员。山东省烟台市生物、生化研究所, 烟台 264000。

收稿日期: 1997-01-22, 修回日期: 1997-02-28