

二价金属离子激活铜超氧化物歧化酶 断裂 DNA 的活性

周若瑜¹, 韩迎春¹, 蒋伟¹, 杨浩¹, 刘长林²

(1. 华中科技大学化学系, 武汉 430074; 2. 华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079)

摘要 以铜超氧化物歧化酶(Cu_nSOD , $n=1\sim 4$)作为野生型 CuZnSOD 突变体的一种模型, 研究了其在二价金属离子(Mg^{2+} , Mn^{2+})存在下由非氧化途径断裂 DNA 的活性, 并与 CuZnSOD 和脱辅基 SOD(apoSOD)进行了比较. 结果表明, 在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下, Cu_nSOD 断裂 DNA 的活性高于 CuZnSOD 和 apoSOD, 并且 DNA 的断裂活性受二价金属离子浓度、pH 及酶浓度等因素影响. 相对活性及动力学参数的测定结果表明, Cu_nSOD 断裂 DNA 的相对能力按 $\text{Cu}_1\text{SOD} < \text{Cu}_2\text{SOD} \approx \text{Cu}_4\text{SOD} < \text{Cu}_3\text{SOD}$ 的顺序变化.

关键词 CuZnSOD; Cu_nSOD ; 水解; DNA 断裂

中图分类号 O614

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)02-0212-05

铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)广泛存在于动植物的多种器官和组织中, 主要功能是催化超氧阴离子歧化为过氧化氢和氧气, 维持细胞内活性氧物种内稳态^[1]. 真核细胞的 CuZnSOD 是分子量为 32000 的同源二聚体, 每个单体结合一个 Cu 和一个 Zn.

肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)是一种致命的神经退行性疾病, 表现为大脑、脑干和脊髓中运动神经元的选择性退化. 研究发现, 部分 ALS 患者的病症可能与体内存在的 CuZnSOD 突变体有关, 其中包括缺锌含铜突变体^[2~4]. 目前对 CuZnSOD 突变体导致运动神经元退化的机理仍不清楚, 但可以肯定, 不是因其活性丧失而是其新功能导致了 ALS^[5,6] 发生.

Dowjat^[7], Ling^[8] 和 Wang^[9] 等报道了 CuZnSOD 可断裂 DNA, Mg^{2+} 的加入增强了这种 DNA 断裂活性. 我们的研究表明, CuZnSOD 和 apoSOD 在二价金属离子(Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等)存在下具有核酸酶活性, 由水解途径非特异地断裂 DNA^[10]. 另外, 以体内可能存在的含铜超氧化物歧化酶(Cu_nSOD , $n=1\sim 4$)作为 CuZnSOD 突变体的一种模型^[4,11], 我们^[12] 发现, 在 H_2O_2 存在下它经水解和氧化两种途径断裂 DNA. 本文研究了 Cu_nSOD 在二价金属离子(Mg^{2+} , Mn^{2+})存在下断裂 DNA 的性质. 结果表明, Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下 Cu_nSOD 经非氧化途径断裂 DNA, 且反应速率比 CuZnSOD 和 apoSOD 更快.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血铜锌超氧化物歧化酶冻干粉(Roche 公司), 质粒 pBR322 DNA(TaKaRa 公司), λ DNA(上海华美公司), 电泳级琼脂糖(Promega 公司), 电泳上样缓冲液为含 0.2 mol/L 的 EDTA、质量分数为 0.25% 的溴酚蓝及 0.25% 的二甲苯氰 FF 的 30% 的甘油水溶液. 其它试剂均为分析纯, 所有溶液均用三次去离子水配制.

DYY-III-4 型电泳仪(北京六一仪器厂)及 Bio-Rad 凝胶成像分析系统(Bio-Rad Laboratories, Inc.).

1.2 铜超氧化物歧化酶(Cu_nSOD)的制备

脱辅基 SOD 按照 McCord 和 Fridovich^[13] 报道的方法制备, 用原子吸收光谱法测定 Cu 和 Zn 的含量. 将制得的 apoSOD 溶解在 pH=5.5, 0.25 mol/L 的醋酸钠缓冲液中, 分别滴加 1~4 倍 apoSOD 摩尔

收稿日期: 2006-06-02.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20571028)资助.

联系人简介: 刘长林(1962 年出生), 男, 教授, 主要从事生物无机化学研究. E-mail: liuchl@mail.hust.edu.cn

量的 CuSO_4 , 得到重组的 Cu_nSOD ^[14,15].

1.3 二价金属离子激活 Cu_nSOD 断裂 DNA 的活性

向 10 μL 20 mmol/L pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液(含 4 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD 及 0 ~ 30 mmol/L Mg^{2+} 或 0 ~ 20 mmol/L Mn^{2+}) 中加入 17.4 $\mu\text{mol/L}$ (碱基对浓度) λDNA , 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min. 加入 2 μL 电泳上样缓冲液, 于 0 $^\circ\text{C}$ 终止反应, 用质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶于 80 V 电泳 90 min, 用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴乙锭染色, 进行 Bio-Rad 成像分析.

向 10 μL 20 mmol/L pH = 5.0 的醋酸钠缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} 和 0.67 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD , 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 和 0.33 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD) 中加入 17.4 $\mu\text{mol/L}$ pBR322 DNA, 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 0 ~ 40 min, 考察二价金属激活 Cu_nSOD 断裂 DNA 的活性.

向 10 μL 20 mmol/L pH = 5.0 的醋酸钠缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} 和 0 ~ 0.67 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD , 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 和 0 ~ 0.33 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD) 中加入 17.4 $\mu\text{mol/L}$ pBR322 DNA, 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min, 考察 Cu_nSOD 断裂 DNA 的相对活性.

1.4 pH 对 Cu_nSOD 断裂 DNA 的影响

向 10 μL 20 mmol/L 不同 pH 的缓冲溶液(pH = 4.0 ~ 5.6 的醋酸钠, pH = 6.0 ~ 7.0 的 Mops, pH = 7.5 ~ 10.0 的 Tris-HCl, 含 5 mmol/L Mg^{2+} 和 0.67 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD , 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 和 0.23 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD) 中加入 17.4 $\mu\text{mol/L}$ pBR322 DNA, 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min.

1.5 Cu_nSOD 断裂 DNA 的动力学

1.5.1 反应速率常数的测定 向 70 μL 20 mmol/L pH = 5.0 的醋酸钠缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} 和 0.33 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD , 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD) 中加入 17.4 $\mu\text{mol/L}$ pBR322 DNA, 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应, 每隔 5 min 取出 10 μL 反应液, 加入 2 μL 电泳上样缓冲液, 于 0 $^\circ\text{C}$ 终止反应.

1.5.2 米氏动力学实验 向 10 μL 20 mmol/L pH = 5.0 的醋酸钠缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} 和 0.33 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD , 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD) 中加入 0 ~ 48 $\mu\text{mol/L}$ 的 pBR322 DNA, 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min.

2 结果与讨论

2.1 Cu_nSOD 的制备

在弱酸性条件下向 apoSOD 溶液中依次加入 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 时, 金属离子很容易进入到各自的天然结合部位^[16]. 单独加入 Cu^{2+} 时, 过量的 Cu^{2+} 进入到 Zn^{2+} 的天然结合部位, 从而获得 Cu_nSOD ($n = 1 \sim 4$)^[14,15]. 由于 Cu^{2+} 进入 SOD 的活性中心, 故这种 SOD 酶的活性可以得到大部分恢复^[17].

2.2 二价金属离子激活 Cu_nSOD 断裂 DNA 的活性

在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下, Cu_1SOD 和 Cu_3SOD 断裂 λDNA 的琼脂糖凝胶电泳如图 1 所示. 结果显示, 单独 Cu_nSOD 不能断裂 DNA, 加入 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 可激活其断裂 DNA 的活性. Mg^{2+} 在低浓度下对 Cu_nSOD 断裂 DNA 的活化作用较弱, 在高浓度下有抑制效应, 最佳浓度为 (5 ± 2) mmol/L; Mn^{2+} 在较宽的浓度范围(0.5 ~ 20 mmol/L)内都具有强活化作用, 而且活化效率明显高于 Mg^{2+} .

在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下, Cu_nSOD 断裂 pBR322 DNA 反应中, 各种形式 DNA(sc, 超螺旋; oc, 缺口; lin, 线性)的含量随时间的变化如图 2 所示. Mg^{2+} 存在时, 超螺旋 DNA 含量随反应时间延长逐渐减小, 缺口含量逐渐增大, 但没有线性形式出现; Mn^{2+} 存在时

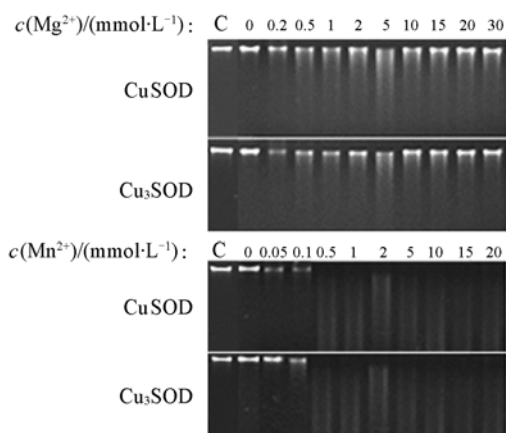


Fig. 1 Gel electrophoresis results of λDNA

17.4 $\mu\text{mol/L}$ λDNA was incubated with 4 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD ($n = 1, 3$) and 0—30 mmol/L Mg^{2+} or 0—20 mmol/L Mn^{2+} for 60 min. C is DNA control.

超螺旋 DNA 的含量随时间增加逐渐减小, 缺口含量先增大后趋于稳定, 而线性含量逐渐增大. 这些结果表明, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 促进 Cu_n SOD 断裂 pBR322 DNA 的反应历程可能不同. 在一定的酶浓度下, Mg^{2+} 倾向于促进 pBR322 DNA 断裂成缺口形式, 而 Mn^{2+} 存在下 pBR322 DNA 断裂成缺口形式后很快又被转变成线性形式.

核酸酶断裂 DNA 时需要二价金属作为辅因子, 不同金属离子对核酸酶活性具有不同程度的活化作用, 碱土金属离子如 Mg^{2+} 促进 DNA 单链断裂成缺口形式, 而过渡金属离子如 Mn^{2+} 促进 DNA 双链断裂^[18]. Cu_n SOD 酶断裂 DNA 的活性随 Mg^{2+} 浓度的增大呈现出先增大后减小的趋势, 一方面可能是由于 Mg^{2+} 与底物 DNA 的结合影响了 Cu_n SOD 与 DNA 的结合; 另一方面可能是由于过量 Mg^{2+} 的存在导致离子强度效应增大, 从而影响了反应过程. 此外, 过渡金属离子 (Mn^{2+}) 可与嘌呤上的 N7/NH₂ 形成五元螯合环, 从而破坏了 A···T 氢键的稳定性^[19], 导致 Mn^{2+} 对 Cu_n SOD 断裂 DNA 具有更强的活化作用.

2.3 Cu_n SOD 断裂 DNA 的相对活性

定义 5 mmol/L Mg^{2+} 或 0.5 mmol/L Mn^{2+} 存在下, 60 min 内将 17.4 μ mol/L 超螺旋形式的 pBR322 DNA 完全转变为缺口和线性形式所需要的 Cu_n SOD 酶浓度为一个酶相对活力单位. 用剩余超螺旋 pBR322 DNA 的百分含量对 Cu_n SOD 浓度作图, 由图得到各种 SOD 断裂 pBR322 DNA 的相对酶活力数据(表 1). 结果表明, Cu_n SOD 酶的相对活性明显比 CuZnSOD 和 apoSOD 的大, 呈现如下变化规律: Cu_1 SOD < Cu_2 SOD \approx Cu_4 SOD < Cu_3 SOD. 这种现象说明 Cu_4 SOD 断裂 DNA 的过程与其它 Cu_n SOD 有所区别, 这可能是铜的结合影响了 Cu_n SOD 的结构, 从而导致酶活性的差别.

Table 1 Relative enzyme activity of CuZnSOD, apoSOD and Cu_n SOD (μ mol/L)

Metal ion	CuZnSOD	apoSOD	Cu_1 SOD	Cu_2 SOD	Cu_3 SOD	Cu_4 SOD
Mg^{2+} (5 mmol/L)	7.2	4.0	1.3	0.72	0.62	0.68
Mn^{2+} (0.5 mmol/L)			0.56	0.45	0.40	0.43

2.4 pH 对 Cu_n SOD 断裂 DNA 的影响

在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下, Cu_n SOD 在 pH = 4.6 ~ 8.0 范围内都能够断裂超螺旋 pBR322 DNA, 最适 pH 为 5.0 ± 0.5 (图 3).

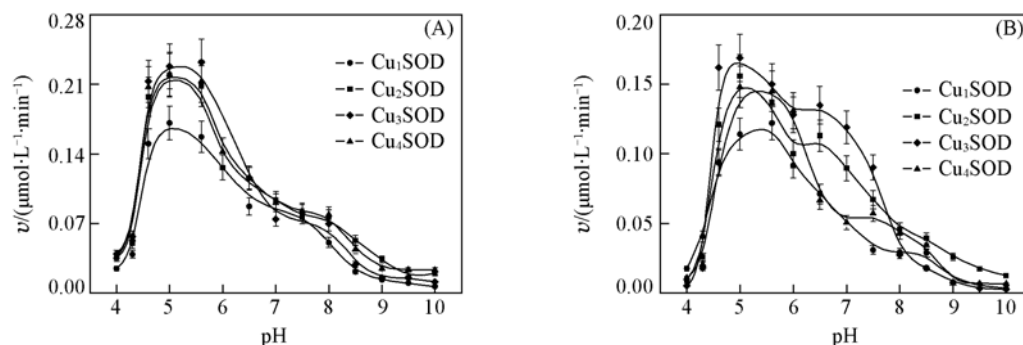


Fig. 3 Plots of average rates (v) as functions of pH in the presence of 5 mmol/L Mg^{2+} (A) and 0.5 mmol/L Mn^{2+} (B)

用 Cu_n SOD 断裂 DNA 反应的平均速率 v 对 pH 作图得到了含有两个平台的曲线(图 3), 此曲线与“多酶-底物复合物”模型^[20] [式(1)和式(2)]符合. 该模型假设多种酶-底物复合物生成最后产物, 酶-

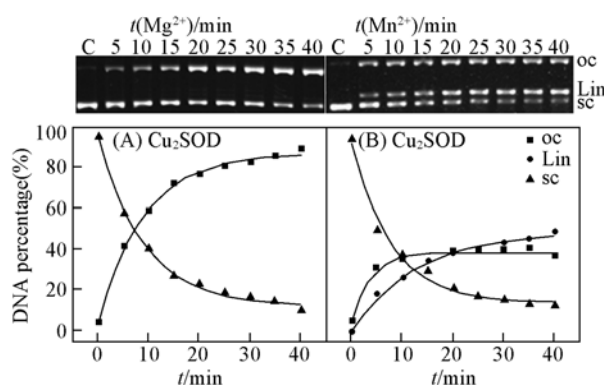


Fig. 2 The time dependences of DNA cleavage with plasmid DNA as substrate

(A) 5 mmol/L Mg^{2+} , 0.67 μ mol/L Cu_2 SOD, (B) 0.5 mmol/L Mn^{2+} , 0.33 μ mol/L Cu_2 SOD. C is DNA control.

底物复合物上有两个可解离的控制酶活性的基团, 用式(1)和式(2)拟合实验数据得到了参与 Cu_nSOD 断裂 DNA 反应的可能氨基酸残基的 $\text{p}K_a$ 值(表 2).

$$\frac{1}{v} - \frac{1}{v'} = \frac{K_{a_2}(1 - \alpha)}{v'([\text{H}^+] + \alpha K_{a_2})} \quad (1)$$

$$\text{p}K_{a_1} + \text{p}K_{a_2} = 2\text{pH}_{\max} \quad (2)$$

式中, v' 和 pH_{\max} 分别为 v -pH 曲线较高平台对应的反应速率和 pH, α 为 v -pH 曲线较低与较高平台对应反应速率的比值, K_{a_1} , K_{a_2} 分别为参与断裂 DNA 反应的可能氨基酸残基的酸性侧链和碱性侧链的表现解离常数. $\text{p}K_{a_1}$ 在 3.70 ~ 4.28 之间, $\text{p}K_{a_2}$ 在 6.06 ~ 6.50 之间, 分别与天冬氨酸侧链 $\beta\text{-COOH}$ ($\text{p}K_R = 3.86$) 和组氨酸侧链咪唑基 ($\text{p}K_R = 6.00$) 的表现解离常数接近. 由牛的 CuZnSOD 的晶体结构图可以看到, 位于 CuZnSOD 表面且相邻近的组氨酸和天冬氨酸有 His19 和 Asp96, 或 His118 和 Asp122/Asp123, 前者位于 CuZnSOD 的 β -折叠片上, 后者位于静电环上^[21]. 由于静电环上某些带正电荷的残基有利于 Cu_nSOD 和带负电荷的 DNA 结合, 因此推测参与 Cu_nSOD 断裂 DNA 反应的氨基酸可能是 His118 和 Asp122/Asp123.

Table 2 The $\text{p}K_a$ values of the relevant residues at the hydrolytic sites of Cu_nSOD to pBR322 DNA cleavage reactions in the presence of 5 mmol/L Mg^{2+} or 0.5 mmol/L Mn^{2+}

Metal ion	pK	Cu_1SOD	Cu_2SOD	Cu_3SOD	Cu_4SOD
Mg^{2+}	$\text{p}K_{a_1}$	3.86	3.77	3.88	3.70
	$\text{p}K_{a_2}$	6.34	6.43	6.32	6.50
Mn^{2+}	$\text{p}K_{a_1}$	4.01	4.14	3.87	4.28
	$\text{p}K_{a_2}$	6.39	6.06	6.33	6.12

Table 3 Kinetic parameters of DNA cleavage by Cu_nSOD in the presence of 5 mmol/L Mg^{2+} or 0.5 mmol/L Mn^{2+}

Metal ion	Kinetic parameter	CuZnSOD	apoSOD	Cu_1SOD	Cu_2SOD	Cu_3SOD	Cu_4SOD
Mg^{2+}	k_1/min^{-1}	6.9×10^{-3}	1.2×10^{-2}	1.4×10^{-2}	1.8×10^{-2}	2.9×10^{-2}	2.0×10^{-2}
	$K_m/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	37	58	29	40	41	49
	$V_{\max}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	5.2×10^{-7}	7.6×10^{-7}	7.4×10^{-7}	1.5×10^{-6}	1.6×10^{-6}	1.5×10^{-6}
	$k_{\text{cat}}/\text{min}^{-1}$	1.56	2.3	2.24	4.24	4.82	4.57
	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	0.4×10^5	0.4×10^5	0.8×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	0.8×10^5
Mn^{2+}	k_1/min^{-1}	5.75×10^{-3}	1.2×10^{-2}	1.4×10^{-2}	1.9×10^{-2}	2.1×10^{-2}	1.9×10^{-2}
	$K_m/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	69	73	76	76	82	79
	$V_{\max}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	1.3×10^{-6}	1.8×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.2×10^{-6}	2.8×10^{-6}	2.4×10^{-6}
	$k_{\text{cat}}/\text{min}^{-1}$	13.3	18.4	20	22.5	27.6	24.1
	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	1.93×10^5	2.52×10^5	2.63×10^5	2.9×10^5	3.4×10^5	3.1×10^5

2.5 Cu_nSOD 断裂 DNA 的动力学

控制断裂 pBR322 DNA 反应中 Cu_nSOD 的浓度, 使反应只生成缺口 DNA. 按照准一级反应动力学对实验结果进行处理, 得到 pBR322 DNA 由超螺旋形式转变为缺口形式的反应速率常数 k_1 (表 3).

k_1 的大小随着 Cu_nSOD 中铜离子个数的增加呈现如下规律: $\text{Cu}_1\text{SOD} < \text{Cu}_2\text{SOD} \approx \text{Cu}_4\text{SOD} < \text{Cu}_3\text{SOD}$. 用米氏方程对 Cu_nSOD 断裂 pBR322 DNA 反应的动力学数据进行处理, 结果表明, 该反应符合米氏稳态动力学(图 4), 拟合的各项稳态动力学参数列于表 3.

从米氏常数 K_m 和催化特异性常数 k_{cat}/K_m 可见, 在二价金属激活 Cu_nSOD 断裂 DNA 反应中酶与底物 DNA 的亲水性较弱, 断裂 DNA 活性较低. 初步推测反应的可能途径如下: 首先 Cu_nSOD 与 DNA 结

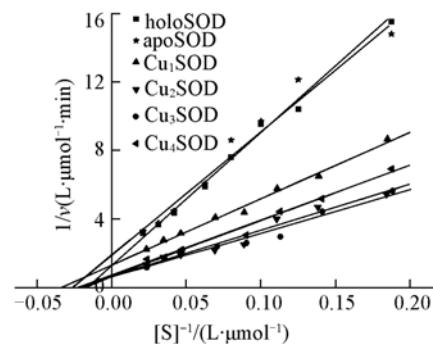


Fig. 4 The double reciprocal plots for kinetic data

0—48 $\mu\text{mol/L}$ pBR322 was incubated with 0.33 $\mu\text{mol/L}$ Cu_nSOD for 50 min in the presence of 5 mmol/L Mg^{2+} .

合形成酶-底物复合物, 然后发生断裂反应, 二价金属可能参与整个过程. 对比 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 存在下的数据发现, Mg^{2+} 更利于结合过程, 而 Mn^{2+} 更利于断裂过程, 最终结果是 Mn^{2+} 存在下 Cu_n SOD 断裂 DNA 的活性更高. 此外, 米氏动力学常数与酶相对活性及速率常数 k_1 的变化规律一致, 与 Cu^{2+} 个数无关, 可推测 Cu_n SOD 断裂 DNA 可能是 SOD 蛋白质、 Cu^{2+} 及 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 起协同作用的结果.

参 考 文 献

- [1] Fridovich I. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. [J], 1974, **41**: 35—97
 [2] Rosen D. R., Siddique T., Patterson D., *et al.*. Nature[J], 1993, **362**: 59—62
 [3] Deng H. X., Hentati A., Tainer J. A., *et al.*. Science[J], 1993, **261**: 1047—1051
 [4] Valentine J. S., Doucette P. A., Potter S. Z.. Annu. Rev. Biochem. [J], 2005, **74**: 563—593
 [5] Reaume A. B., Elliott J. L., Hoffman E. K., *et al.*. Nat. Genet. [J], 1996, **13**: 43—47
 [6] Bruijn L. I., Houseweart M. K., Kato S., *et al.*. Science[J], 1998, **281**: 1851—1854
 [7] Dowjat W. K., Kharatishvili M., Costa M.. Biometals[J], 1996, **9**: 327—335
 [8] Ling Jun, Gao Xiang, Liu Wang-Yi, *et al.*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. [J], 1998, **30**: 1123—1127
 [9] Wang Bao-Zhong, Wei Xu-Bin, Liu Wang-Yi. Acta Bioch. Bioph. Sin. [J], 2004, **36**: 609—617
 [10] Jiang W., Shen T., Han Y. C., *et al.*. J. Biol. Inorg. Chem. [J], 2006, **11**: 835—848
 [11] Tiwari A., Xu Z. S., Hayward L. J.. J. Biol. Chem. [J], 2005, **280**: 29771—29779
 [12] Han Y. C., Shen T., Jiang W., *et al.*. J. Inorg. Biochem., 2007, **101**: 214—224
 [13] McCord J. M., Fridovich I.. J. Biol. Chem. [J], 1969, **244**: 6049—6055
 [14] Fee J. A., Briggs R. G.. Biochim. Biophys. Acta[J], 1975, **400**: 439—450
 [15] Valentine J. S., Pantoliano M. W., McDonnell P. J., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. [J], 1979, **76**: 4245—4249
 [16] Beem K. M., Rich W. E., Rajagopalan K. V.. J. Biol. Chem. [J], 1974, **249**: 7298—7305
 [17] XU Tong-Min(徐通敏), ZHOU Tian-Shu(周天舒), JIN Li-Dao(金利道). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1995, **16**(11): 1700—1702
 [18] Cowan J. A.. Chem. Rev. [J], 1998, **98**: 1067—1088
 [19] Rodgers M. T.. Acc. Chem. Res. [J], 2004, **37**: 989—998
 [20] Tipton K. F., Dixon H. B.. Methods in Enzymology[M], New York: Academic Press, 1979, **63**: 183—234
 [21] Hough M. A., Strange R. W., Hasnain S. S.. J. Mol. Biol. [J], 2000, **304**: 231—241

Divalent Metal Ion-activated DNA Cleavage Activity of Copper Superoxide Dismutase

ZHOU Ruo-Yu¹, HAN Ying-Chun¹, JIANG Wei¹, YANG Hao¹, LIU Chang-Lin^{2*}

(1. Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; 2. Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract The study examined the DNA cleavage activity mediated by each member of the Cu^{2+} -containing forms of $CuZnSOD$ (Cu_nSOD , $n = 1—4$) in the presence of exogenous Mg^{2+} or Mn^{2+} . The result indicates that upon addition of Mg^{2+} or Mn^{2+} , Cu_nSOD can more efficiently cleave DNA *via* a hydrolytic pathway compared with its holo- and apo-forms. The factors, such as exogenous divalent metal concentration, pH and enzyme concentration, can affect the DNA cleavage activity. We also measured the relative enzyme activity and the steady state kinetic parameters of the DNA cleavage reaction, indicating that the DNA cleavage activity is independent of Cu^{2+} number in Cu_nSOD , and increased in an order of $Cu_1SOD < Cu_2SOD \approx Cu_4SOD < Cu_3SOD$.

Keywords $CuZnSOD$; Cu_nSOD ; Hydrolysis; DNA cleavage

(Ed.: M, G)