| | |
|---|---|
| • 系統編號 | RN9607-1389 |
| • 計畫中文名稱 | 感應耦合電漿原子發散光譜探討超氧化物歧化酵素多重有毒金屬結合容量的效應 |
| • 計畫英文名稱 | Study on the Multiple Toxic Metallic Binding Capacity Effect of Superoxide Dismutase by ICP |
| • 主管機關 | 行政院國家科學委員會 • 計畫編號 NSC94-2113-M038-007 |
| • 執行機構 | 台北醫學大學醫學系 |
| • 本期期間 | 9408 ~ 9507 |
| • 報告頁數 | 12 頁 • 使用語言 中文 |
| • 研究人員 | 陳建志; 劉滄柏; 黃彥華; 施純明; 周志銘 Chen, Chien-Tsu; Liu Tsang-Pai; Huang, Yen-Hua; Shih, Chwen-Ming; Chou, Chih-Ming |
| • 中文關鍵字 | 萎縮性側索硬化症; 銅鋅超氧化物歧化脢; 重金屬; 感應耦合電漿原子發散光譜儀; 圓振二向色性分析 |
| • 英文關鍵字 | ALS; Cu,Zn-SOD; Heavy metal; ICP; Circular dichroism |
| • 中文摘要 | 銅鋅超氧化物歧化脢 Cu, Zn-SOD 蛋白質結合銅鋅兩金屬，結合能力受到基因突變改變，降低 Cu, Zn-SOD 蛋白質之活性。可能是百分之八十五到九十肌肉萎縮性側索硬化症(Amylotrophic Lateral Sclerosis, ALS)偶發性(Sporadic, SALS)的致病原因。本實驗室研究假設重金屬鎘在 SOD 蛋白組合時，干擾同族及性質相近過渡元素的銅鋅，造成活性下降，用於解釋環境因素產生的 SALS。從人類肝臟組織 cDNA 中，利用 RT-PCR 之技術，選殖出人類的 SOD1 基因。以大腸桿菌在 0.5mM 的銅及鋅濃度下過量表現最高酵素活性的 Cu, Zn-SOD，測定大腸桿菌對鎘之最大耐受度爲 500nM。於 SDS-PAGE 與西方墨點法分析可見 23kDa 之 Cu, Zn-SOD 之過量表現。鎘濃度的提高，酵素活性隨之下降。利用石墨爐式原子吸收光譜儀，分析純化之 Cu, Zn-SOD 所含銅和鋅的變化，顯示隨著鎘濃度提高，每毫克之 Cu, Zn-SOD 之鎘的含量亦隨之增高；相反的，鋅含量卻隨之減少，但銅則無變化。因此鎘金屬影響 Cu, Zn-SOD 蛋白質之活性降低，是經由影響鋅在 Cu, Zn-SOD 的結合力。利用圓振二向色性分析二級結構變化，發現鎘會造成 α-helix 和 β-sheet 結構的增加。鎘影響 Cu, Zn-SOD 蛋白質之活性降低，除了少數鎘金屬的取代外，造成鋅離子的大量流失，機制爲鎘誘導金屬硫蛋白大量的表現結合鋅離子，造成結合至 Cu, Zn-SOD 蛋白質中的鋅離子相對的流失，對於探討偶發性 ALS 之致病機制，提供一個新的方向。除了同族的元素外，文獻報導鉛、鋁、砷、矽等會影響細胞的抗氧化狀態，改變 Cu, Zn-SOD 的活性，是否影響酵素結合銅鋅兩金屬能力，目前正在進行探討。我們提出新的假設，多重金屬元素的不當影響蛋白表現時，可能影響 Cu, Zn-SOD 的活性。利用感應耦合電漿原子發散光譜儀(ICP)同時偵測多種金屬，探討多重金屬結合容量(MBC, Multi-Metal binding capacity)的效應，觀察汞鉛砷銅鋅 |

| | |
|---|---|
| | 鉻鎘等對分子的合成的影響，蛋白合成後的摺疊是一個熱力學上的步驟，在一個多重污染的環境下，分子如何取捨金屬將是一個重要的課題。本研究結果顯示(1)利用單細胞大腸菌的 Cu, Zn-SOD 蛋白表現系統，觀察在汞鉛砷銅鋅鉻鎘等金屬環境下，以 ICP 分析 Cu, Zn-SOD 分子內的金屬含量，金屬濃度上升時 Cu, Zn-SOD 活性下降；(2)篩減參予的金屬離子，發現汞砷離子的結合力最高，推測金屬介入分子內屬於亂度結合及誘發鋅的流失。 |
| • 英文摘要 | Amylotrophic Lateral Sclerosis (ALS), a progressive neurodegenerative disorder cases, 10% are familial and 90% are sporadic. The mutations found in the Cu,Zn-SOD (SOD1) are the causes of 20% of familial ALS. Most mutations cause the decrease of the SOD enzyme activity and some of them are due to the loss of zinc affinity or alteration of zinc binding site. Zinc and cadmium constitute group IIB of the periodic table of elements and are uniformly divalent. They share certain common biological responses. In order to investigate the possible causes of heavy metal interactions, we have constructed, expressed, and purified human Cu,Zn-SOD in E. coli with equal amounts of copper and zinc but different concentrations of cadmium in LB broth. First, SDS-PAGE and western blot analysis illustrated a 23kDa monomer. Second, the more cadmium added, the lower enzyme activities remained. Third, by atomic absorption spectrophotometer, we found that the more cadmium added, the more cadmium atoms and the less zinc atoms detected in purified Cu,Zn-SOD. The results of observation and estimation of the purified Cu,Zn-SOD protein structure from native gel and circular dichroism indicate that the structure of apo-SOD, without any metals, |