

中枢神经系统靶向性 Mn-SOD 的克隆和在大肠杆菌中的表达研究

张艳红 贺华君 袁勤生*

(华东理工大学生物化学研究所, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

杨卫东 吴祥甫*

(中国科学院上海生物化学与细胞生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 靶向性超氧化物歧化酶 (SOD) 是治疗氧自由基引起神经细胞损伤所致疾病等的有效途径. 将破伤风毒素 C 部分 (tetanus toxin fragment C, TTC) 基因与编码 Mn-SOD 的 cDNA 融合克隆进 pET-22b(+) 载体, 1 mmol/L 异丙基-D-硫代半乳糖 (IPTG) 诱导在大肠杆菌中表达. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 图谱可见约 71 ku 有表达产物条带, 与理论计算值相符; 蛋白质印迹 (Western blot) 分析显示, 表达产物与抗 Mn-SOD 及破伤风毒素的多抗有免疫反应, 而且表达产物用邻苯三酚自氧化法测定具有 SOD 活性. 融合蛋白可作为有效的试剂靶向性输送 Mn-SOD 到神经元细胞, 这为进一步研究靶向性 SOD 的治疗中枢神经系统的相关疾病提供了基础.

关键词 锰超氧化物歧化酶, 破伤风毒素 C 部分, 融合表达, 中枢神经系统, 靶向性运输

学科分类号 Q786

近年来的研究表明, 人 Mn-超氧化物歧化酶 (SOD) 是一个由位于 6q25 的核基因编码的抗氧化酶, 有活性的 Mn-SOD 蛋白最后定位于线粒体基质. Mn-SOD 基因的表达既可因细胞受到辐射、氧化试剂或还原试剂、细胞因子、病毒感染等因素的刺激而显著提高, 也可随细胞的癌变而大幅降低^[1]. Gorecki 等^[2] 比较了 rhMn-SOD 与 rhCu, Zn-SOD 在抗炎及抗辐射方面的临床应用. 发现 rhCuZn-SOD 的生物半衰期只有 6~10 min, 而 rhMn-SOD 则为 5~6 h, 因此 rhMn-SOD 在慢性病的治疗方面可能更加有效.

大约 30 种不同的 hCuZn-SOD 点突变, 已发现能导致一种以运动神经元死亡为特征的致命的尚无法治疗的神经退化疾病——家族性肌萎缩侧索硬化 (familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS)^[3,4]. CuZn-SOD 引起的 FALS 约占所有的遗传性 FALS 的 15%~20%, 可能与其毒性分子的决定簇有关^[5]; 其中有证据表明 CuZn-SOD 突变所致酶活力的丧失能加重 FALS 疾病. 因此补充外源 SOD 应能延滞 FALS 病人运动神经元细胞的退化和死亡, 找到合适的靶向性载体将 SOD 输送到运动神经元细胞, 将为氧自由基所造成的细胞损伤的治疗

带来希望; 同时避免出现能引起 FALS 的 SOD 变体十分重要. 破伤风毒素 C 片段是相对分子质量为 50 000 的蛋白质, 含有毒素和神经细胞受体结合部位, 不具备神经毒活性, 在动物实验中能有效诱导小鼠形成中和抗体, 并可耐受毒素攻击. 这些特性使得 Bizini 等^[6] 将破伤风毒素 C (TTC) 作为靶向性运输蛋白到神经细胞, 目前 TTC 已经与许多蛋白质包括一些酶化学偶联, 被证实促进了培养的神经元细胞和实验动物模型中的运动神经元细胞的吸收^[7]. Mn-SOD 也已在大肠杆菌中表达^[8,9], 但靶向性 Mn-SOD 融合肽的研究国内外尚未见报道, 本文将 TTC 基因与编码人 Mn-SOD 的 cDNA 融合, 并在大肠杆菌中表达. 也许 TTC 与 Mn-SOD 的融合, 既可以利用 TTC 的神经元细胞结合和内部化能力作为靶向性, 输运蛋白质到运动神经元细胞, 又能避免该 CuZn-SOD 的可能毒性. 拟为 Mn-SOD 靶向到中枢神经系统, 探索为氧自由基相关的神经性疾病提供有效治疗手段.

* 通讯联系人.

袁勤生 Tel: 021-64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

吴祥甫 Tel: 021-64374430-292, E-mail: xfwu@sunm.shcnc.ac.cn

收稿日期: 2001-01-05, 接受日期: 2001-04-28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、试剂、质粒: 大肠杆菌菌株 T8G1、BL21 (DE3); 载体 pSK、pET-22b(+), 为中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所吴祥甫教授组保存; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、低熔点琼脂糖、碱性磷酸酶底物 NBT 和 BCIP、IPTG 和 X-gal 等试剂均为 Gibco BRL 公司产品。DNA 测序试剂盒为 USB 公司产品; $[^{35}\text{S}]$ -dATP 为 Amersham 公司产品; 丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺等为 Sigma 公司产品; 异丙基 D-硫代半乳糖 (IPTG) 为 Boehringer Mannheim 公司产品; DNA 回收试剂盒为华舜公司产品; 标准破伤风毒素抗体来自中国生物制品检定所; 碱性磷酸酯酶 (AKP) 标记的多克隆抗体为华美生物公司产品; 其余试剂均为进口或国产分析纯; SD 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心。

1.1.2 PCR 引物: MrSOD 引物 1: 5'-TACCAT-GGAAGCACAGCCTCCCCGACG-3', 含 *Nco*I 位点, 引物 2 为 5'-ACTCTAGATCCGCCTCCACCCCTTTT-GCAAGCC ATG-3', 含 *Xba*I 位点; TTC 引物 1 为 5'-CGTCTAGAAAAATC TGGATTGTTGGG TTG-3', 含 *Xba*I 位点; 引物 2 为 5'-GCCTCGAGCTGTTTAA-TCATTTGTCCA TCG-3', 含 *Xho*I 位点。

1.2 方法

1.2.1 基因操作: 质粒提取、酶切、连接、转化、鉴定等按文献 [10] 略加修改进行。

1.2.2 MrSOD 与 TTC 基因融合及大肠杆菌表达质粒的构建: 用 MrSOD 引物 1 和引物 2 以装有 MrSOD 基因的 pBlue MrSOD 质粒为模板^[10] 进行 PCR 扩增, 条件为: 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 75 s, 30 个循环, 最后延伸 10 min。扩增后的产物平端连入 pSK (+) 载体, 连接产物转入大肠杆菌 TG1, 经测定其序列正确后以 *Nco*I 及 *Xba*I 酶切, 低熔点胶分片段; 用 TTC 引物 1 和引物 2 以含 TTC 基因的 pSKTTC 质粒为模板^[11] 进行 PCR 扩增, 94℃ 变性 45 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 120 s, 30 个循环, 最后延伸 10 min。扩增后的产物平端连入 pSK (+) 载体, 连接产物转入大肠杆菌 TG1, 经序列测定正确后以 *Xba*I 及 *Xho*I 酶切, 低熔点胶分片段。把两片段和经 *Nco*I 及 *Xho*I 双酶切的载体 pET-22b (+) 相连接, 构建重组质粒 pET-22-MT, 连

接产物转入大肠杆菌 TG1, 并经酶切鉴定, 表达质粒如图 1。

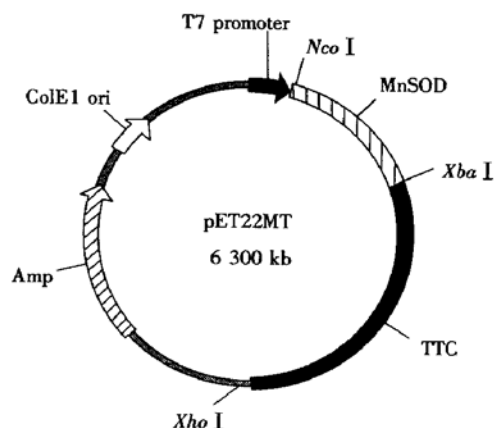


Fig 1 Schematic representation of donor plasmid pET-22-MT

1.2.3 MrSOD 与 TTC 融合基因在大肠杆菌中的表达: 所用表达质粒 pET-22b (+) 启动子为噬菌体的 T7 启动子, IPTG 诱导, 含表达质粒的单克隆菌 BL21 (DE3) 37℃ 培养过夜, 2% 转接于 6 ml LB 培养基中, 37℃ 培养 2 h 后, 取 1 ml 菌液, 测光吸收值 A_{600} ; 并收集菌体作为诱导表达前的对照, 其余菌液中加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 加 Mn^{2+} 至终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$, 最佳诱导表达条件 A_{600} 为 0.4~0.6 左右, IPTG 诱导表达约 3 h 后, 取 1 ml 菌液测 A_{600} 并收集菌体。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blot): 按文献 [10] 进行, 诱导前和诱导后的样品按 A_{600} 值为 0.1 时 10 μl PBS 悬浮菌体, 加等体积的 2× 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行 12% SDS-PAGE 后, 以考马氏亮蓝染色。蛋白质印迹在 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上。分别以兔抗人 MrSOD 多克隆抗体和抗破伤风毒素标准抗体为一抗, AKP 标记的多克隆抗体为二抗, 用诱导前样品作阴性对照。

1.2.5 SOD 活性测定: 收集的菌体溶于 PBS, 超声处理, 取上清用邻苯三酚法^[12] 测定表达产物的酶活性, 以诱导前样品作为阴性对照。

1.2.6 $[^{125}\text{I}]$ rTTC 的标记和在体逆行轴突运输: ^{125}I 标记用氯胺 T 法, 标记好的 r MrSOD/TTC 约 1.480×10^7 Bq。选取约 200 g 的 SD 大鼠, 用乙醚麻醉, 手术暴露其左坐骨神经; 将神经在股部结扎, 修复伤口后, 注射 100 μl 浓度为 1 g/L 的 $[^{125}\text{I}]$ rMrSOD/TTC 到左后腿肌肉内。18~24 h 后断头处死大鼠, 把坐骨神经取出, 将坐骨神经结

扎处离中枢神经的近端和远端把其分别依次剪成 3 mm 长的片段, 放射性记数^[13].

2 结 果

2.1 Mn SOD 与 TTC 基因融合及表达质粒的构建

Mn-SOD 与 TTC 基因融合的中间连入了一段编码连接肽 (GGGG) 的 12 个核苷酸和编码两个氨基酸残基 SR 的 *Xba*I 酶切位点, 以保证两蛋白质的空间构型相互影响较少, 并保持阅读框架不变. 重组子序列见图 2.

```

NcoI
CCATGGGTAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACGGCGCCCTGGAACCTCACATCAACGGCGAGATCATG
  M G K H S L P D L P Y D Y G A L E P H I N A Q I M
CAGCTGCCACACAGCAAGCACCACGCGCCTACGTGAGCAACCTGAACGTACCGAGGAGAAGTACCAGGAGCGGTG
  Q L H H S K H H A A Y V S N L N V T E E K Y Q E A L
GCCAAGGAGATGTTACAGCCAGATAGCTCTTCAGCCTGCACTGAAGTTCAATGGTGGTGCATATCAATCATAGC
  A K G D V T A Q I A L Q P A L K F N G G G H I N H S
ATTTCTGGACAAACCTCAGCCTAACGGTGGTGGAGAACCAGGGGAGTGTCTGGAAGCCATCAACGTGACTTT
  I F W T N L S P N G G G E P K G E L L E A I K R D F
GGTTCCTTTGACAAGTTAAGGAGAAGCTGACGGCTGCATCTGTTGGTGTCCAAGGCTCAGGTTGGGGTTGGCTTGGT
  G S F D K F K E K L T A A S V G V Q G S G W G W L G
TTCATAAGGAACGGGACACTTACAAATGCTGCTTGTCCAAATCAGGATCCACTGAACAGGCCTTATCCACTGCT
  F N K E W G H L Q I A A C P N Q D P L Q G T T G L I
GGGGATTGATGTGTGGGAGCAGCTTACTACCTTCAGTATAAAATGTCAGGCTGACAAGGAAGTTATCTAAAAGCT
  P L L G I D V W E H A Y Y L Q Y K N V R P D Y L K A
XbaI
ATTGGAATGTAATCAACTGGGAGAATGTAAGTAAAGATACATGGCTTGCAAAAAGGGTGGAGCGGATCTAGA
  I W N V I N W E N V T E R Y M A C K K G G G S R
AAAAATCTGGATTGTTGGGTTGATAATGAAGAAGATATAGATGTTATATAAAAAGAGTACAATTTTAAAT
  K N L D C W V D N E E D I D V I L K K S T I L N
TTAGATATTAATATGATATTATATCAGATATATCTGGGTTTAATTCATCTGTAATAACATATCCAGATGCTCAATTG
  L D I N N D I I S D I S G F N S S V I T Y P D A Q L
GTGCGCGGAATAAATGGCAAAGCAATACATTTAGTAAACAATGAATCTTCTGAAGTTATAGTGCATAAAGCTATGGAT
  V P G I N G K A I H L V N N E S S E V I V H K A M D
ATTGAATATAATGATATGTTTAATAATTTTACCGTTAGCTTTTGGTGGAGGTTCTTAAAGTATCTGCTAGTCATTTA
  I E Y N D M F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L
GAACAATATGACACAAATGAGTATTCAATAATAGCTCTATGAAAAATATAGTCTATCAATAGGATCTGGTGGAGT
  E Q Y D T N E Y S I I S S M K K Y S L S I G S G W S
GTATCACTTAAAGTAATAACTTAATATGGACTTTAAAGATTCCGCGGAGAGTTAGACAAATAACTTTTGGGAT
  V S L K G N N L I W T L K D S A G E V R Q I T F R D
TTATCTGATAAATTAATGCTTATTTAGCAAATAAATGGGTTTTTATACTATTACTAATGATAGATTATCTTCTGCT
  L S D K F N A Y L A N K W V F I T I T N D R L S S A
AATTTGTATATAAATGGAGTACTTATGGGAAGTGCAGAAATTACTGGTTTAGGAGCTATTAGAGAGGATAATAATATA
  N L Y I N G V L M G S A E I T G L G A I R E D N N I
ACATTAAGAACTAGATAGATGAATAATAATCAATACGTTTCTATTGATAAATTTAGGATATTTTGCAAAGCATTAA
  T L K L D R C N N N N Q Y V S I D K F R I F C K A L
AATCCAAAAGAGATTGAAAATTATACACAAGTTATTTATCTATAACCTTTTAAAGAGACTTCTGGGAAACCTTTTA
  N P K E I E K L Y T S Y L S I T F L R D F W G N P L
CGATATGATACAGAATATTATTAATACAGTAGCTTATAGTTCTAAAGATGTTCAATTGAAAAATATAACAGATTAT
  R Y D T E Y Y L I P V A Y S S K D V Q L K N I T D Y
ATGTATTGACAAATGCCCATCGTATACTAACGGAATTTGAATATATATTATAGAAGGTTATATAGTGACTAAAA
  M Y L T N A P S Y T N G K L N I Y Y R R L Y S G L K
TTTATTATAAAAGATATACCTAATAATGAAATAGATTCTTTTGTAGATCAGGTGATTTTATTAATATATATGTA
  F I I K R Y T P N N E I D S F V R S G D F I K L Y V
TCATATAACAATAATGAGCACATTGTAGTTATCCGAAAGATGGAATGCCTTTAAATCTTGATAGAATTCTAAGA
  S Y N N N E H I V G Y P K D G N A F N N L D R I L R
GTAGGTATAATGCCAGGTATCCCTCTTTATAAAAAATGGAAGCAGTAAATTCGCTGATTAAAAACCTATTCT
  V G Y N A P G I P L Y K K M E A V K L R D L K T Y S
GTACAACTTAAATATATGATGATAAGATGCATCTTTAGGATTAGTGGTACCCATAATGGTCAATAGGCAACGAT
  V Q L K L Y D D K D A S L G L V G T H N G Q I G N D
CCAAATAGGGATATATTAATGCAAGCACTGGTACTTAAATCATTAAAAAGATAAACTTAAACATGTGATTGGTAC
  P N R D I L I A S N W Y F N H L K D K T L T C D W Y
TTTGTACCTACAGATGAAGGATGGACAAATGATTAAACAGCTCGAG
  F V P T D E G W T N D end XhoI

```

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Mn-SOD/TTC gene

2.2 MnSOD/TTC 基因在大肠杆菌中的表达

从 SDS-PAGE 结果 (图 3) 可以看到, 诱导后的样品有明显的表达条带, 凝胶灰度扫描从标准曲线上可见其表达的分子质量约为 71 ku, 与其理论推算值相符. 蛋白质印迹显示, 经诱导后的表达产物在分子质量为 71 ku 处有呈阳性结果, 而对照没有, 可见表达的 MrSOD/TTC 与兔抗人 MrSOD 多克隆抗体和抗完整的破伤风毒素标准抗体有免疫结合反应 (图 4).

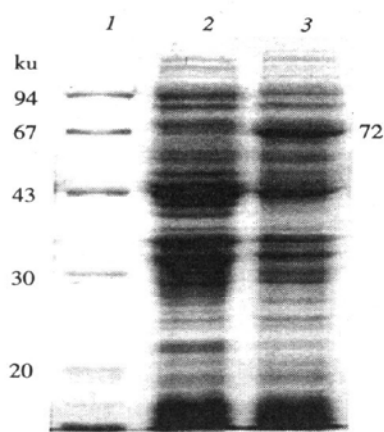


Fig 3 SDS PAGE analysis of MrSOD/TTC expression products in *E. coli*

1: standard protein marker; 2: sample before IPTG induction; 3: sample after IPTG induction.

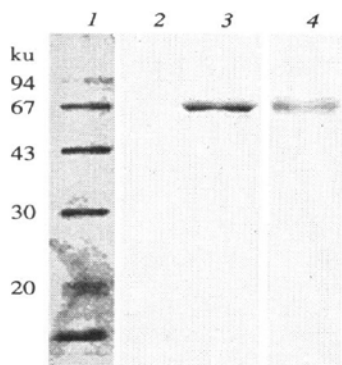


Fig 4 Western blot analysis of MrSOD/TTC expression products in *E. coli*

1: standard protein marker; 2: sample before IPTG induction; 3: sample after IPTG induction using polyclonal antibody to MrSOD as the first antibody; 4: sample after IPTG induction using polyclonal antibody to tetanus holotoxin as the first antibody.

大肠杆菌发酵液离心收集菌体, 超声波破碎、离心, 经凝胶过滤、金属螯合层析纯化后, MrSOD/TTC 的最终得率为 2 mg/L.

2.3 重组融合表达产物的 SOD 活性测定

邻苯三酚法测定结果表明大肠杆菌诱导表达的

产物具有 SOD 活性, 其单位活力为 2 608 U/ml, 比活为 86 U/mg; 而重组的人 MrSOD 的单位活力为 4 894 U/ml, 比活为 387 U/mg. 分析其原因可能是因为 TTC 的相对分子质量为 50 000 的蛋白质, 故重组的 MnSOD/TTC 的蛋白量远大于重组人 MrSOD 的蛋白量, 故前者的比活大大低于重组人 MrSOD 的比活.

2.4 逆行轴突运输实验

破伤风毒素被认为能通过逆行轴突运输进入中枢神经系统. 这种过程可以通过结扎周围神经, 测定 ^{125}I 标记的 r MnSOD/TTC 是否在结扎的远端部分积累来进行评估^[13]. 本实验结果显示, ^{125}I 标记的 r MnSOD/TTC 能在坐骨神经结扎的远端部分积累 (图 5). 因此可以认为, 表达的重组融合蛋白具有逆行轴突运输进入中枢神经系统的功能.

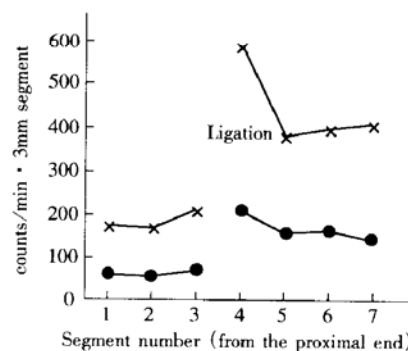


Fig 5 Retrograde axonal transport of ^{125}I -labeled MnSOD/TTC

Data are expressed as counts per minute of accumulation in each 3 mm section of sciatic nerve proximal or distal to the ligation successively (ligature between 3 and 4). 1 ~ 7: from the proximal end to distal end successively. × — ×: purified rTTC protein^[9], • — •: expression products of MrSOD/TTC. Ligation: ligation between 3 and 4.

3 讨 论

本研究利用已克隆到的 MrSOD 基因与 TTC 基因进行拼接构建了 MrSOD/TTC 融合表达质粒 pET-22-MT, pET-22b (+) 为分泌型表达载体, 可将表达产物分泌到大肠杆菌内膜与细胞外膜之间的周质, 易于其分离纯化. SDS-PAGE 图谱显示在分子质量为 71 ku 处有明显的表达条带, 这与 MrSOD/TTC 基因编码的理论推算值相符; 且蛋白质印迹图谱也显示在分子质量为 71 ku 处有明显的条带, 表明表达产物能与兔抗人 MrSOD 多克隆抗体和抗完整的破伤风毒素标准抗体有免疫反应.

MrSOD 与 TTC 之间设计了一段连接肽 GGGG 和编码 Xba I 酶切位点的两个氨基酸残基 SR 使其构象之间的影响最少. SOD 的活性实验表明, 表达产物具有 SOD 的酶部分活性; C 端区域

的TTC被认为是结合细胞表面神经节苷脂所必需的,表达产物的逆行轴突运输实验证实融合产物能通过逆行轴突运输进入中枢神经系统。

由此可见,我们构建、表达的融合蛋白一方面具有SOD的酶活性,另一方面具有通过逆行轴突运输进入中枢神经系统的能力,为探索中枢神经系统由氧自由基损伤所引起的疾病的靶向性治疗创造了条件;而且能避免CuZn-SOD突变可能带来的毒性作用,另外,该融合蛋白也为Mn-SOD的基因突变是否也有类似因CuZn-SOD突变而引起毒性的体外动物模型提供了基础;为我们进一步了解FALS等与氧自由基有关神经性疾病的发病机制和治疗有重要的意义。

参 考 文 献

- Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, *et al.* SOD₂, a new type of tumor suppressor gene? *Int J Cancer*. 1992, **51** (5): 476~480
- Gorecki M, Beck Y, Hartman J R, *et al.* Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Rad Res Comms*, 1991, **12~13** (4): 401~410
- Deng H X, Hentati J A, Tainer Z, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and structure defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, 1993, **261** (10): 1047~1051
- Rosen D R, Siddique T, Patterson D, *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993, **362** (1): 59~62
- Orrell R W, Belleruche J, Marklund S L, *et al.* Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature*, 1995, **378** (4): 342~343
- Bizini B, Stoeckel K, Schwab M. An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and various neuron systems. *J Neurochem*, 1977, **28** (6): 529~542
- Beaude P, Delacour A, Bizzini B, *et al.* Retrograde axonal transport of an exogenous enzyme covalently linked to B-lab fragment of tetanus toxin. *Biochem J*, 1990, **271** (1): 87~91
- Borgstahl G E, Page H E, Hickey M J, *et al.* The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, 1992, **71** (1): 107~118
- 施惠娟, 贺华君, 魏东芝, 等. 人Mn-SOD cDNA的克隆及高效表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (6): 718~721
- Shi H J, He H J, Wei D Z, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 1999, **31** (6): 718~721
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 883~1042
- 贺华君, 何志勇, 施惠娟, 等. 破伤风毒素C部分的克隆和在大肠杆菌中的表达. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (4): 18~22
- He H J, He Z Y, Shi H J, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2000, **32** (4): 18~22
- 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进. *医药工业*, 1988, **19** (5): 217~219
- Xie W H, Yao J F, Yuan Q S. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 1988, **19** (5): 217~219
- Price D L, Griffin J, Young A, *et al.* Tetanus toxin: Direct evidence for retrograde intraaxonal transport. *Science*, 1974, **188** (9): 945~947

Cloning and Expression of Targeting Mn-SOD to Central Nervous System in *E. coli*

ZHANG Yan-Hong, HE Hua-Jun, YUAN Qin-Sheng*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering and Institute of Biochemistry,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

YANG Wei-Dong, WU Xiang-Fu*

(Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The nontoxic fragment C of tetanus toxin (TTC) can transport other proteins from the circulation to central nervous system motor neurons. Increased levels of CuZn-SOD are protective in experimental models of stroke and Parkinson's diseases, where mutations in SOD may cause motor neuron disease. Here the human Mn-SOD is linked to tetanus toxin fragment C gene to construct the fusion gene, then was ligated into prokaryotic expression vector pET-22b(+). expression of the plasmid in *E. coli* resulted in the production of a protein has a subunit molecular mass of 71 ku and is recognized by both anti-Mn-SOD and anti-tetanus toxin antibody. The Mn-SOD moiety retains substantial enzymatic activity, where the TTC moiety can deliver the fusion protein to central nervous system neurons. Such fusions should provide a powerful tool for investigating the protective and destructive roles of Mn-SOD in motor neurons.

Key words manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), tetanus toxin fragment C, fusion expression, central nervous system, targeting delivery

* Corresponding author. YUAN Qin-Sheng, Tel: 86-21-64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

WU Xiang-Fu, Tel: 86-21-64374430-292, E-mail: xfwu@sunm.shenc.ac.cn

Received: January 5, 2001 Accepted: April 28, 2001