

超氧化物歧化酶化学修饰的初步研究

区耀华 吕冬 周昕

(清华大学生物科学与技术系 北京)

提 要

本文以三聚氰氯为活化剂,采用聚乙二醇法对超氧化物歧化酶进行化学修饰,得到了均一的聚乙二醇-SOD 加合物。修饰酶活力为天然酶的 75%,表明酶活性中心结构基本保持。

对修饰酶残留氨基的测定表明,近 80% 可滴定氨基参加了反应,且 SOD 骨架结构在修饰前后变化不大,可以推测聚乙二醇是连结在蛋白质表面上的。

引 言

近年来的研究表明,氧自由基与人类的健康和疾病密切相关^[1]。氧自由基可以破坏机体细胞,活化致癌物而导致肿瘤发生,引起炎症和自身免疫性疾病,并可促使机体衰老。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的氧自由基清除剂,因而它在临床治疗及机体保护方面都有着重要的意义。

要把 SOD 应用于实际,存在着较多问题。首先是 SOD 在体内存留时间短,另外还有异体蛋白免疫原性问题。当前解决问题的方法主要是依靠:(1)脂质体包裹。(2)高分子对蛋白质表面化学修饰。在第二种方法中,所用的

高分子是多种多样的^[2,3]。目前看来,修饰效果以聚乙二醇较为理想^[4]。

蛋白质化学修饰的聚乙二醇法有如下特点:首先是反应条件温和,且酶活性保持较好。其次,聚乙二醇-蛋白加合物水溶性好。此外,聚乙二醇无毒无免疫原性,且具有较好的生物相容性。因此,这是一种较有前途的修饰方法。

本文以三聚氰氯为活化剂,采用聚乙二醇法对 SOD 进行化学修饰,并对修饰后得到的加合物进行了初步研究。

实 验 方 法

一、材料及仪器

牛超氧化物歧化酶、2, 4, 6-三硝基苯磺

关系等问题,还有待进一步深入探讨,但是,我们认为这条 γ 酶带的发现对男性生育机理的深入研究有重要的意义。

此项研究曾得到申冬珠、冯群先,华一珊三位副教授的关心帮助,专此致谢。

参加此项工作的还有中医系在校研究生 翟亚春,一并致意。

参 考 文 献

- [1] 须藤加代子:《临床病理》特集第 60 号,1984, 68.
- [2] Bianco, A, et al.: *Science*, 1963, **139**, 601.

- [3] 吴持平:《国外医学计划生育分册》,1987, **1**, 21.
- [4] 吴果诚等:《中华医学检验杂志》,1983, **6**, 202.
- [5] 赵树铭:《国外医学临床生化与检验学分册》,1986, **6**, 19.
- [6] Podlasek, S.J. et al.: *clin. chem.* 1984, **30**, 1270.
- [7] Podlasek, S.J. et al.: *clin. chem.* 1985, **31**, 527.
- [8] 杨振华:《同功酶测定》,南通医学院出版,江苏南通, 1979.
- [9] 梁志国:《生殖与避孕》,1985, 5 卷 3 期, 3.
- [10] Mirjana Gavell et al.: *Cellular and Molecular BIOLOGY*, 1984, **30**(1), 85.
- [11] 王梦玖,滕春英:《生殖免疫学》,中国展望出版社,北京 1986 276—311.

[本文于 1988 年 4 月 27 日收到]

酸 (TNBS) 均为中科院上海生化所产品。聚乙二醇为 Fluka 产品。三聚氰氯为 Serva 产品。

紫外可见分光光度计 UVIKON 860。圆二色仪 JASCO J-500。

二、聚乙二醇的活化

三聚氰氯使用前用新鲜蒸馏过的无水苯重结晶两次。

5.5 g 三聚氰氯、10 g 无水碳酸钠及 40 g 聚乙二醇加入 400 ml 无水苯中, 常温下搅拌过夜, 过滤。用乙醚沉淀出产物, 再用苯溶解沉淀。如此沉淀、溶解反复多次, 直至紫外检测无三聚氰氯吸收。真空干燥, 得白色固态粉末。此活化聚乙二醇在冰箱中密封保存。

三、活化聚乙二醇对 SOD 的修饰

10 mg SOD 加入 0.65 g 活化聚乙二醇, 在 pH 9.2 的四硼酸钠溶液中反应 1 小时, 产物用 pH 7.3 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液透析, 冰冻干燥后得白色粉末状的聚乙二醇-SOD 加合物。

四、修饰效果的检验

1. 残留氨基的测定^[5] 取 1 ml 含 0.1—1 mg 蛋白的溶液, 加入 1 ml 4% pH 8.5 碳酸氢钠溶液, 1 ml 10% 十二烷基磺酸钠溶液, 20 分钟后加入 1 ml 0.1% TNBS 溶液, 40℃ 保温 2 小时, 用 0.5 ml 1 mol/L 的盐酸终止反应。325nm 下读光吸收值。同样浓度的蛋白质在修饰前后光吸收值之比即为残留氨基量。

蛋白质浓度用双缩脲法测定。

2. 电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳。浓缩胶浓度 2.5%, 分离胶浓度 7%。

五、SOD 活力测定

邻苯三酚测活法 0.1 mol/L pH 8.2 的 Tris- 盐酸缓冲体系。

六、修饰前后结构的变化

分别取浓度为 0.05 mg/ml 的 SOD 及聚乙二醇-SOD 加合物进行圆二色谱测量。

结果与讨论

采用文中的实验条件获得了聚乙二醇-SOD 加合物。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明,

聚乙二醇-SOD 加合物与 SOD 相比, 电泳速度大大下降。但不论 SOD 或其加合物, 其电泳条带都比较专一、均匀。这表示耦联反应进行得比较完全、均一。

本文用邻苯三酚法测定了耦联前后 SOD 的活力。结果表明, 达到 50% 抑制率时所需的 SOD 及聚乙二醇-SOD 加合物分别为 2.5 $\mu\text{g}/9\text{ ml}$ 及 3.35 $\mu\text{g}/9\text{ ml}$ (均以 SOD 的含量为基准)。故耦联后的活力为天然酶的 75%, 即修饰后酶活力能大部分保持。这说明酶活性部位的结构受耦联影响不大。

为了观察修饰前后 SOD 的二级结构变化情况, 本文分别对修饰前后的 SOD 进行了圆二色谱测量(图 1, 2)。从测定的 CD 谱中可以看出, SOD 是一个以 β 折叠为主要成分的蛋白, 这与文献^[6]报道是一致的。根据图 1, 2 的

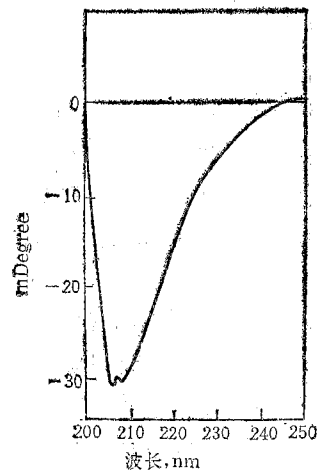


图 1 SOD 的 CD 谱

相似性, 可以认为 SOD 的主链结构在修饰前后变化是不大的。

通过 TNBS 滴定, 测定了聚乙二醇-SOD 加合物中残留氨基的百分比为 21%。这表明近 80% 的可滴定氨基与聚乙二醇相联结。联系上述实验现象, 即酶的活性部位与骨架结构经修饰后仍得到较好的保持, 可以认为聚乙二醇主要联结于酶的表面。

SOD 经修饰后酶活力部分下降, 也从另一个侧面反映了环围着酶的聚乙二醇层的存在。

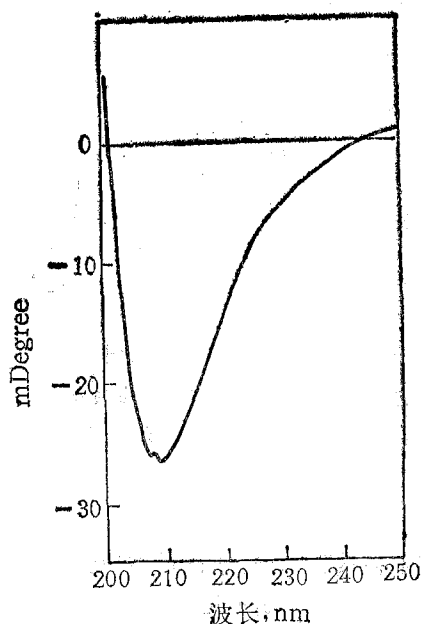


图2 修饰后 SOD 的 CD 谱

聚乙二醇层的形成,使得小分子底物与酶的接触受到一定的阻碍。然而,也正是由于聚乙二醇层的形成,在酶表面形成了屏障,保护该酶免受体内蛋白酶消化,为延长 SOD 在体内停留时间提供有利条件。

关于蛋白免疫原性问题,目前认为,蛋白质的表面抗原决定簇大多由亲水氨基酸组成,大多数情况下,亲水性较强的赖氨酸残基是其中

(上接第 208 页)

部分抗抽提和抗消化的 DNA 和 RNA 是结合在核内基质结构上。我们已用电镜铺展方法直接观察到大核 DNA 与核内基质纤维的结合关系,这一实验结果将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Berezney, R.: *Chromosomal Nonhistone Proteins*, CRC Press, Inc. Boca Raton, 1984, 4, 119—180.
- [2] Bouteille, M. et al.: *Int. Rev. Cytol.*, 1983, 83, 135.
- [3] Bureau, J. et al.: *Biol. Cell*, 1986, 56, 7.
- [4] Jackson, D. A. et al.: *J. Cell Sci.*, 1984, 1(suppl.), 59.
- [5] Hemminki, K. et al.: *Cancer Lett.*, 1979, 6, 167.
- [6] Zhai Zhonghe et al.: *J. Virol.*, 1987, 61, 1007.
- [7] Smith, H. C. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 10a.
- [8] 饶玉树、汪德耀:《中国细胞生物学会第三次会议论文摘要汇编》,1986,63.

重要组分。本文采用的聚乙二醇是 SOD 非活性部位赖氨酸中 ϵ -氨基的化学修饰剂。Cu、Zn-SOD 含 20 个赖氨酸残基。实验表明,耦联过程中约有 80% 可滴定氨基与分子量较大的聚乙二醇连接。可以设想,蛋白质表面抗原决定簇将部分地或全部地被掩盖,免疫原性也将因而下降。1977 年 A. Abuchowski 等人研究了蛋白质的聚乙二醇修饰^[7]。通过控制耦联反应中活化聚乙二醇的用量,获得了残留氨基百分比不同的加合物。随着加合物中被修饰氨基百分比的增加,蛋白质免疫原性下降。当此百分比达一定值后,加合物既无免疫原性也无抗原性。这表明耦联到蛋白质上的聚乙二醇是通过掩盖蛋白质表面的抗原决定簇而起作用的。

参 考 文 献

- [1] Phatak, P. S.: *Res. Commun. Chem. Pharmacol.*, 1980, 29, 113.
- [2] 张元亮:《生化药物杂志》1987,(1),17.
- [3] Von Specht, B. U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 484, 109.
- [4] Abuchowski, A.: *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3582.
- [5] Habeeb, A. F. S. A.: *Anal. Biochem.*, 1966, 11, 328.
- [6] Weser, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 243, 203.
- [7] Abuchowski, A.: *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3578.
- [8] Savoca, K. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 578, 47.
- [9] Bao Shideng(鲍仕登) & Wang Deyao: *Proceedings of Second Beijing Conference and Exhibition on Instrument Analysis*, 1987, 73—74.
- [10] Swanton, M. T. et al.: *Chromosoma*, 1982, 77, 217.
- [11] Prescott, D. M. et al.: *Chromosoma*, 1971, 34, 355.
- [12] Lin Meiying et al.: *J. Protozool.*, 1985, 32, 144.
- [13] Wunderlich, F. et al.: *J. Cell Biol.*, 1977, 73, 217.
- [14] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [15] Burton, K.: *Methods Enzymol.*, 1968, 12B, 163.
- [16] 张龙翔等编:《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,1981,220—221.
- [17] 上海市医学化验所主编:《临床生化检验》上册,上海科学出版社,1979,185—187.
- [18] Smith, H. C. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 1974.
- [19] Kaufmann, S. H. et al.: *Exp. Cell Res.*, 1981, 132, 105.
- [20] Fisher, P. A. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, 92, 674.
- [21] van Venrooij, W. J. et al.: *The Nuclear Envelope and Nuclear Matrix*, Alan R. Liss, New York, 1982, 235.

[本文于 1988 年 5 月 3 日收到]