

双链聚乙二醇与超氧化物歧化酶共价结合物的 理化和免疫学性质

王继华* 曹淑桂 程玉华

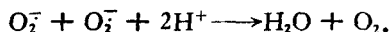
(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 136023)

提 要

用三聚氯氰活化单甲氧基聚乙二醇, 得到了双链聚乙二醇(PEGm₂), 以PEGm₂修饰牛血 Cu, Zn-SOD, 得到了氨基修饰率为 30%, 残余活力为 80% 的纯 PEGm₂-SOD. 修饰酶的荧光光谱及圆二色谱均有改变; 盐酸胍变性及胃蛋白酶水解实验结果表明, 修饰酶的稳定性高于天然酶; 免疫学实验表明, 与天然酶比较, 修饰酶的免疫原性及抗原抗体反应性大为降低.

关键词 Cu, Zn-SOD, 单甲氧基聚乙二醇, 共价修饰, 免疫原性

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, 简称 SOD, EC1.15.1.1), 它催化:



超氧阴离子自由基 (O_2^-) 与许多病理过程如炎症、肿瘤、衰老、休克、氧中毒、辐射损伤等有关, 故在临床上 SOD 作为新型酶制剂, 是有应用前景的. 它与其他酶制剂一样, 属于蛋白质类药物, 易被血浆蛋白水解酶降解, 又多来自于动物或微生物, 在应用中存在着体内半衰期短, 具有免疫原性及抗原性体反应性. 本文试图用无免疫原性的水溶性大分子——双链聚乙二醇 (PEGm₂) 对 SOD 进行共价修饰, 并对其理化性质及免疫学性质与天然酶进行比较研究.

1 材料与方 法

1.1 材料

SOD 来自牛血, 为上海东风试剂厂产品, 比活 50 000U/mg (黄嘌呤氧化酶-NBT 法); 单甲氧基聚乙二醇购自 Sigma 公司产品, 分子量 5 000; 三聚氯氰, 三硝基苯磺酸 (TNBS), 胃蛋白酶及盐酸胍分别为四平化工厂, 浙江黄岩城关助剂厂, 上海食品公司制药厂, 上海化学试剂厂产品; 弗氏佐剂由白求恩医科大学提供; 小白

兔购自白求恩医科大学动物室; 其他试剂均为分析纯试剂.

1.2 方法

SOD 的共价修饰及修饰酶的纯化参见文献[1], 用三聚氯氰活化单甲氧基聚乙二醇(分子量 5 000), 得到活化的单甲氧基双链聚乙二醇(分子量 10 000, 简称 PEGm₂). 将 PEGm₂ 与 SOD 进行共价交联, 以 Sephadex G-100 柱纯化之, 得到纯化的 PEGm₂-SOD.

SOD 活力测定采用改良的邻苯三酚自氧化法^[2].

蛋白浓度测定采用 Lowry 法.

修饰程度测定采用 TNBS 法^[3].

荧光光谱测定在日立 850 型荧光光谱仪上进行.

圆二色谱测定在 J-500C 型圆二色谱仪上进行.

盐酸胍变性实验 蛋白浓度为 0.32mg/ml 的天然 SOD 及修饰 SOD (PEGm₂-SOD), 于 6mol/L 的盐酸胍中, 在 37℃ 保温, 于 30min, 1h, 2h, 4h 分别测定残余活力.

* 通讯地址: 暨南大学医学院生化教研室, 广州 510632.

收稿日期: 1991-09-24 修回日期: 1993-03-19

胃蛋白酶水解实验 蛋白浓度为 0.32 mg/ml 的 SOD 及 PEG_m-SOD, 在 pH 3.0, 0.1 mol/L 的甘氨酸缓冲液中, 与浓度为 0.5 mg/ml 的胃蛋白酶液混合, 37℃ 保温, 于 30 min, 60 min 分别测定残余活力。

SOD 和 PEG_m-SOD 免疫原性测定 体重为 2.5 kg 的纯种雄性兔 4 只, 随机分为 2 组, 按文献[4]法免疫, 制备 SOD 及 PEG_m-SOD 抗血清。按文献[5]采用琼脂双扩散法测定抗

体滴度。

SOD 和 PEG_m-SOD 与 SOD 抗血清结合能力测定 采用定量免疫沉淀曲线法^[6]。

2 结 果

2.1 修饰剂浓度对 SOD 活力及修饰程度的影响

表 1 给出了不同修饰剂浓度时酶的残余氨基率及残余活力。残余氨基率反映了修饰程度,

表 1 Cu, Zn-SOD 修饰结果

Table 1 The results of modification of Cu, Zn-SOD

修饰剂 Modifier	SOD-NH ₂ /修饰剂 SOD-NH ₂ /modifier	残余酶活力 Remained enzyme activity (%)	残余氨基率 Ratio of remained -NH ₂ groups (%)
PEG _m	1:0.5	97.6	91.8
	1:1	92.8	83.4
	1:2	83.3	73.1
	1:3	80.5	70.1
	1:5	80.5	69.1

残余氨基率越小, 表示修饰程度越大。随着修饰剂浓度的增大, 修饰程度加大, 酶残余活力降低。当 SOD 的 -NH₂ 与修饰剂摩尔比为 1:5 时, 其残余氨基率及残余活力基本接近于定值, 显示二者的结合达到了暂时的饱和。

2.2 修饰酶的分离纯化

图 1 示二个活力峰, 第二峰与天然 SOD 洗脱峰位置对应, 在 76 ml 处; 第一峰较第二峰明显前移, 在 48 ml 处, 为 PEG_m-SOD 峰。说明 Sephadex G-100 柱能很好地将未反应完全的 SOD 与 PEG_m-SOD 分离开来。

2.3 天然酶与修饰酶光谱性质分析

浓度为 1 μmol/L 的天然酶及不同修饰比的修饰酶, 在激发波长 $\lambda_{ex}=278\text{nm}$ 下, 测荧光发射光谱, 如图 2 示。荧光强度以天然酶最高。修饰酶中, 随着修饰剂与 SOD-NH₂ 摩尔比的增加而减弱。最大发射波长轻度红移。

以 pH 7.6, 50 mmol/L 磷酸缓冲液或含 PEG_m 的磷酸缓冲液扫基线, 作天然 SOD、PEG_m-SOD 的圆二色谱(修饰酶中, 修饰剂/SOD-NH₂ = 2:1(mol/mol)) 如图 3 示, 可见修饰酶的 $[\theta]_{208}$ 负吸收值有所减小, 但 $[\theta]_{222}$

值变化不大。

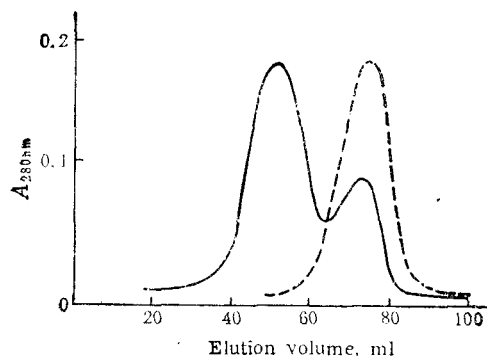


图 1 PEG_m 修饰的 SOD 在 Sephadex G-100 柱上的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of modified Cu, Zn-SOD with PEG_m on Sephadex G-100 Column

柱大小: 1.4 cm × 7.0 cm, Column: 1.4 cm × 7.0 cm;
洗脱液: pH 7.6, 2.5 mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄;
Eluent: pH 7.6, 2.5 mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄;
流速: 6 ml/h; flow rate: 6 ml/h

— PEG_m-SOD, --- SOD

2.4 修饰酶的抗盐酸胍变性能力

在 6 mol/L 盐酸胍中, 37℃, 保温 2 h 时, 天然酶残余活力只有 25%, 而修饰酶尚能保持 50% 的活力。表明修饰酶较天然酶有较强的

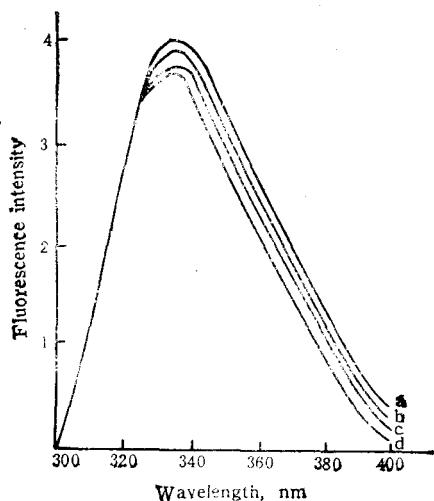
图 2 SOD 和 PEG_{m2}-SOD 的荧光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of Cu, Zn-SOD and modified Cu, Zn-SOD with PEG_{m2}, $\lambda_{ex} = 278\text{nm}$, a: SOD; b, c, d: PEG_{m2}-SOD; $\text{mol}_{\text{SOD-NH}_2}:\text{mol}_{\text{PEGm}_2} = 1:1, 1:2, 1:3$.

SOD-NH₂ 与 PEG_{m2} 之摩尔比分别是 1:1, 1:2, 1:3

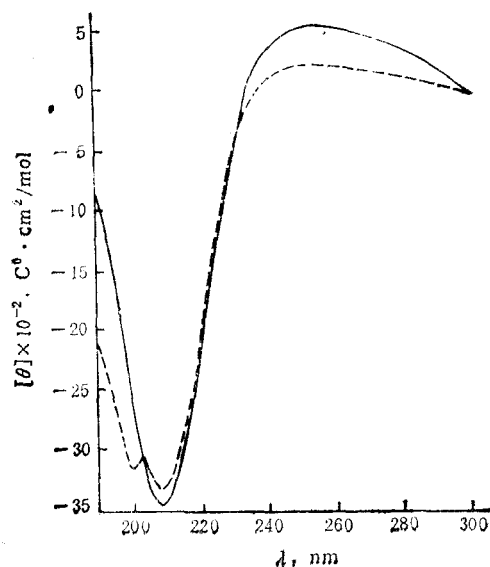
图 3 SOD 和 PEG_{m2}-SOD 的圆二色谱

Fig. 3 The circular dichroism of SOD and PEG_{m2}-SOD

酶浓度: 10 μmol/L

Enzyme concentration: 10 μmol/L

---- PEG_{m2}-SOD; — SOD

抗盐酸胍变性能力(见表 2)。

2.5 修饰酶的抗胃蛋白酶水解能力

表 2 为天然酶及修饰酶的胃蛋白酶水解实验结果。在胃蛋白酶作用 60min 后,天然酶的残余活力仅存 13.9%, 而修饰酶残余活力达 41.4%。

表 2 SOD 和 PEG_{m2}-SOD 对盐酸胍及胃蛋白酶的抵抗能力

Table 2 Abilities of SOD and PEG_{m2}-SOD to resist GuHCl and pepsin

处理试剂 Treated agents	保温时间 Time (h)	残余活力 Remained activity (%)	
		SOD	PEG _{m2} -SOD
GuHCl	0.0	100.0	100.0
	0.5	52.4	85.9
	1.0	50.0	77.2
	2.0	25.0	50.0
	4.0	0.0	3.0
Pepsin	0.0	100.0	100.0
	0.5	20.0	55.0
	1.0	13.9	41.4

2.6 修饰酶的免疫原性

免疫原性测定的琼脂双扩散结果表明兔 SOD 的抗体滴度是 1:2⁶, PEG_{m2}-SOD 的抗体滴度是 1:2¹。

2.7 修饰酶的抗原抗体反应性

图 4 为 SOD, PEG_{m2}-SOD 与 SOD 抗血清结合的免疫沉淀曲线。以 SOD 与抗 SOD

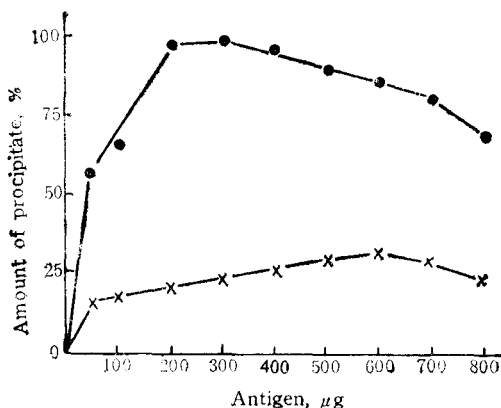


图 4 SOD 和 PEG_{m2}-SOD 与 SOD 抗血清反应的沉淀曲线

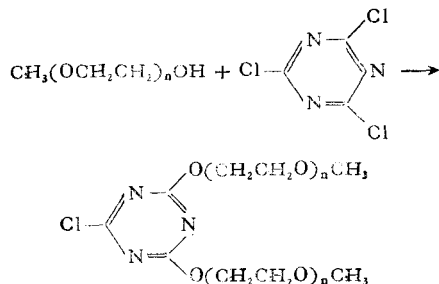
Fig. 4 Precipitate curves of SOD and PEG_{m2}-SOD reacted with SOD antiserum

—•— SOD; ×—× PEG_{m2}-SOD

结合的能力为 100% 计, 则 PEG_{m2}-SOD 与抗 SOD 结合的能力为 27%, 表明修饰酶的抗原抗体结合能力较天然酶降低。

3 讨 论

活化的聚乙二醇共价修饰 SOD, 国外亦有报道, 但结果不一。对于 PEG 的活化, Verones^[7] 采用的是活化酯法; Charles^[8] 采用的是碳酸二咪唑法; Yabuki^[9] 采用的是三聚氯氰法。用前二种方法活化的 PEG 对 SOD 进行共价修饰, 对酶活力的保持较好, 可达 70—90%, 但修饰剂活化中间步骤多, 而且操作繁杂; 用后一种方法活化的 PEG 对 SOD 进行共价修饰, 对酶活力的保持只有 50%。根据我们研究化学修饰的经验^[10,11], 我们选用三聚氯氰活化所得的双链聚乙二醇 (PEG_{m2}) 对 SOD 进行共价修饰, 以求找到方法简便, SOD 活力保持又较好的修饰途径。我们的结果表明, 用 PEG_{m2} 对 SOD 进行修饰, 活力保持在 80% 以上。当氨基修饰率为 30% 时, 酶残余活力为 80%。故这是一条较好的修饰途径。活化的双链聚乙二醇结构为:



修饰酶的荧光强度减弱, 是覆盖在 SOD 分子表面的修饰剂对 SOD 荧光发射基团产生屏蔽作用所致。随着修饰剂浓度的加大, SOD 中自由氨基减少, 即修饰程度加大, 此种屏蔽作用

亦愈强, 此时修饰酶的荧光强度亦愈小, 这与我室报道的对尿酸酶的修饰^[10]结果一致。

修饰酶在 $[\theta]_{20}^{\text{D}}$ 负吸收值的轻度减小及在 $[\theta]_{222}^{\text{D}}$ 负吸收值的几乎不变, 可能是 SOD 经化学修饰后某一局部结构变得松散。但由于 SOD 天然构象中 β -折叠占 45%^[12], α 螺旋仅占 5%, 具有相对的刚性, 故修饰后对 SOD 天然构象, 尤其是二级结构影响不大。以往对尿酸酶, 链激酶, 脂肪酶, L-门冬酰胺酶及核糖核酸酶等的共价修饰, 活力保持均在 10—30% 之间, 而 SOD 共价修饰的报道活力保持均在 40% 以上。可见这种二级结构的相对刚性, 为蛋白质或酶的修饰提供了很好的基础。即在酶分子表面接上大分子后, 酶的构象不易改变, 从而使酶活力保持较好。

修饰酶较强的抗盐酸胍变性能力及抗胃蛋白酶水解能力, 可能是由于亲水性的修饰剂, 在酶分子表面形成了一个溶剂化层, 保护了稳定酶天然构象的次级键, 屏蔽了酶解位点, 或是干扰了蛋白水解酶工作的微环境的缘故。

参 考 文 献

- 1 Matsushima A *et al.* *Chem Letter*, 1980; 773
- 2 Marklund S *et al.* *Eur J Biochem*, 1974; 47:469
- 3 Habeeb A F. *Anal Biochem*, 1966; 14:328
- 4 高天祥著, 临床免疫学与实验技术, 山东: 山东科学技术出版社, 1984; 410—413
- 5 高天祥著, 临床免疫学与实验技术, 山东: 山东科学技术出版社, 1984; 418—419
- 6 陶文训著, 临床免疫学检验, 上海: 上海科学技术出版社, 1983; 298—299
- 7 Veronese F M. *J Pharm Pharmacol*, 1983; 35:757
- 8 Charles O B *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 131:25
- 9 Yabuki. *Eur Pat Appl Ep* 0100467 C12N9/02, 1986
- 10 曹淑桂, 程玉华等, 生物化学与生物物理进展, 1984; (4): 49
- 11 程王华, 赵秋宇等, 生物化学杂志, 1989; 2:102
- 12 Richardson D C. *J Mol Biol*, 1982; 160:181

THE PHYSICAL, CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF COVALENT MODIFIED Cu, Zn-SOD WITH PEG_m

Wang Jihua Cao Shugui Cheng Yuhua

(The National Lab. of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023)

ABSTRACT

Bovine Cu, Zn-SOD was modified by 2,4-bis (O-methoxypolyethylene glycol)-6-Chloro-S-triazine (activated PEG_m) in different rates between amino groups of SOD and PEG_m. The purified PEG_m-SOD that remained 80% residual activity with 30% modified amino groups was obtained. The fluorescence spectrum and circular dichroism of modified SOD were changed; the results of denaturation by GuHCl and of hydrolysis by pepsin showed that PEG_m-SOD had higher stability than SOD; the results of immunology showed that the immunogenicity and antigenicity of PEG_m-SOD decreased greatly.

Key words Cu, Zn-SOD, PEG_m, covalent, Immunogenicity

科技消息

第一届全国镁学术会议纪要

第一届全国镁学术会议于1992年8月24日至26日在北京召开。中国生物物理学会和中国科学院生物物理研究所共同组织了本次会议。来自全国18个省、市、自治区和解放军的科研、教学、医疗、卫生系统的65名专家、学者出席了会议。

会议收到论文近70篇，大会交流30多篇。

还对某些专题进行了自由讨论。这是一次多学科的，基础理论与医学实践相结合的学术交流会。

镁是人体的必需元素，在体内可以激活三百多种酶。镁几乎参与了体内所有的代谢过程，并在蛋白质的合成中发挥着重要作用。镁有保钾与拮抗钙的重要作用。会上交流表明，我国对镁的生物学作用的研究，无论在临床应用还是基础理论方面都取得了可喜的成绩。

在临床方面，代表们报告在心血管系统疾病(心律失常、心衰、急性心肌梗塞)、呼吸系统疾病(肺心病、支气管哮喘)、消化系统疾病(胆绞痛)、内分泌系统疾病(糖尿病、甲亢)、泌尿系统疾病(肾绞痛、泌尿系结石)、

神经系统疾病(椎体外系统疾病等)，以及小儿惊厥、妊娠中毒症等疾病的治疗中镁都发挥了重要作用，特别是在治疗急性心肌梗塞等危重病人时，镁剂发挥了独特的作用。会上还首次报告了镁在治疗耳聋方面的成功经验。

在基础理论方面，报告了在人工膜和天然膜系统中 Mg^{2+} 的作用的研究。在缺血心肌保护研究中，报告了ATP-MgCl₂ 复合物能明显减轻心肌缺血和再灌注的损伤。基础理论方面的研究结果为镁在临床中所显示的作用提供了一定的理论基础。

会议还专门讨论了镁剂(包括高镁中草药)的开发研究。指出为进一步加强镁的研究，要特别注意镁测定中的质控。会议认为，我国应进一步加强镁的生物学作用基础理论方面的研究，以便更好地开展与国际上镁研究的交流。

会议选出了第一届全国镁研究学术委员会成员。

[中国科学院生物物理研究所 聂玉生、赵霖]