

转化基因活性(资料未显示)说明 γ 射线还可能激活其它基因而与 myc 合作而使正常 REC 细胞发生转化. REC : myc : γ 95 细胞中存在的转化基因的进一步鉴定对我们进一步弄清 γ 射线转化细胞的分子机理是十分有用的.

参 考 文 献

- 1 Bishop J M. Cell, 1991; 64: 235
- 2 Guerrero I, Calzada P, Mayer A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 202
- 3 Endlich B, Salavati R, Sullivan T *et al.* Radiat Res, 1992
- 4 Dilella A G, Woo S L C. Methods in Enzymology, 1987; 152: 199
- 5 Graham F L, Van der Eb A J. Virology, 1973; 52: 456
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Guerrero I, Villasante A, Corces V *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 7810
- 8 Shuin T, Billings P C, Lillehaug J R *et al.* Cancer Res, 1986; 46: 5302
- 9 Billings P C, Shuin T, Lillehaug J *et al.* Cancer Res, 1987; 47: 3643
- 10 Borek C, Ong A, Mason H. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 794
- 11 Krolewski B, Little J B. Mol Carcinogen, 1989; 2: 27
- 12 Land H, Parada L F, Weinberg R A. Nature, 1983; 304: 596

长半衰期重组人超氧化物歧化酶的研制及性质

骆训懿 王晶翼 谢邦铁 李战青 刘晓琳 陈晓穗

(海军总医院分子生物学研究室, 北京 100037)

摘要 一种双亲有机化合物聚苯乙烯马来酸丁酯(SMA)经酰胺键与重组人铜锌超氧化物歧化酶(rhCu/Zn SOD)共价交联,制得修饰酶.当42%游离氨基被修饰时,保留酶活力为88%.酶蛋白主链结构在修饰前后变化不大.与天然酶相比,修饰酶的生物半衰期延长了22倍,抗蛋白水解酶能力亦有所增强.

关键词 超氧化物歧化酶,蛋白质化学修饰,聚苯乙烯马来酸丁酯,基因工程

超氧化物歧化酶(SOD)作为新型酶制剂具有重要的医用价值.但是由于生物半衰期短及异体免疫原性等问题,使其临床应用受到局限.我们于1990年得到在大肠杆菌中高效表达,并经亲和层析纯化比活达4000U/mg以上的重组人铜锌SOD(rh Cu/Zn SOD)^[1].但是该基因工程SOD制品仍存在半衰期短的问题.解决的途径之一是对酶分子进行适当的化学修饰.聚苯乙烯马来酸丁酯(SMA)是一种双亲中分子有机化合物,曾作为修饰剂与抗肿瘤药物neocarzinostatin(NCS)交联,通过延长生物半衰期使NCS的药理作用显著增强^[2].本文将SMA与rh Cu/Zn SOD交联,并

对所得修饰酶的理化及生物学性质进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

菌种,本室构建的含pCZS2载体的大肠杆菌.聚苯乙烯马来酸丁酯, Aldrich 产品. Sephadex G75, Pharmacia 产品.

1.2 方法

1.2.1 rh Cu/Zn SOD 在大肠杆菌中的表达^[1] 含pCZS2载体的大肠杆菌接种于LB液体培养基中,32℃振荡培养,当细胞密度达

$A_{600} > 0.4$ 时, 加入硫酸铜液使 Cu^{2+} 浓度达 125ppm, 调温至 42°C , 继续培养. 温度诱导一定时间后, 将培养液离心, 湿菌体称重.

1.2.2 rh Cu/Zn SOD 的分离纯化^[1] 湿菌体溶于一定体积的蒸馏水中, 超声破碎细胞, 离心去除细胞碎片, 上清液经热变性、硫酸铵沉淀后透析除盐. 铜螯合亲和层析柱 ($1.6\text{cm} \times 25\text{cm}$) 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 7.0$) 平衡; 经硫酸铵沉淀并透析后的 rh Cu/Zn SOD 粗制品上柱, 280nm 波长监测, 先以平衡缓冲液淋洗, 当杂蛋白峰洗下后, 改用含 0.5mol/L 氯化钠的 0.02mol/L 柠檬酸盐缓冲液 ($\text{pH } 5.0$) 洗脱 rh Cu/Zn SOD 蛋白. 测定酶活性, 收集 SOD 活性峰, 透析除盐、浓缩、冻干, 产品 -20°C 保存.

1.2.3 SMA 与 rh Cu/Zn SOD 交联及交联产物的分离纯化 参照文献 [3] 略有改良. 将 SMA 的二甲亚砜 (DMSO) 溶液滴加于 rh Cu/Zn SOD 硼酸钠溶液 (0.5mol/L , $\text{pH } 8.0$) 中, SMA 与 rh Cu/Zn SOD 的摩尔比为 $10:1$. 该体系在 37°C 水浴中振摇反应 1h , 于不同时间取样监测 SOD 活性及交联度. 反应液上 Sephadex G75 层析柱 ($1\text{cm} \times 40\text{cm}$), 以 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 7.4$) 洗脱, 收集酶活性峰.

1.2.4 SOD 活性测定 采用光化学扩增法^[4]. 以 rh Cu/Zn SOD 纯品制作标准曲线计算酶活性单位. 蛋白质浓度测定采用 Lowry 法.

1.2.5 交联程度测定 参照三硝基苯磺酸法 (TNBS)^[5].

1.2.6 圆二色谱测定 在日本 Jasco J20C 圆二色谱仪上进行.

1.2.7 蛋白酶水解实验 蛋白浓度为 0.20mg/ml 的 rh Cu/Zn SOD 或 SMA-rh Cu/Zn SOD 在 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 7.4$) 中分别与浓度为 0.2mg/ml 的胃蛋白酶液、胰蛋白酶液混合, 25°C 保温, 间隔 15min 取样一次测定残留酶活力.

1.2.8 生物半衰期测定 雄性 Waster 大鼠, 体重 $200-250\text{g}$, 乙醚吸入麻醉后从尾静脉注

入待测样品 0.25ml (SOD 6000 活性单位). 注射后于不同时间剪尾采血, 分离血清, 测酶活性. 以时间为横坐标, 酶活性百分率为纵坐标绘制曲线.

2 结果与讨论

2.1 修饰剂浓度对 SOD 活力及修饰程度的影响

不同修饰剂浓度对酶的残留活力及残留氨基酸率见表 1. 残留氨基酸率反映了修饰程度. 由

表 1 rh Cu/Zn SOD 的修饰结果

SMA : rh Cu/Zn SOD / (mol : mol)	残留酶活力/%	残留氨基酸率/%
80 : 1	27	8
40 : 1	56.7	13.6
20 : 1	67.7	31
10 : 1	88	58

表 1 可见, 随着修饰剂用量的增大, 修饰程度加大, 残留酶活力降低. 由于参与交联反应的基团为酶分子中非活性位赖氨酸残基的 $\epsilon\text{-NH}_2$, 检测也显示, 交联前后酶蛋白主链结构改变不大 (见后), 因此推测导致酶活力降低的主要原因是空间位阻效应. 预试验中发现, 修饰程度对半衰期长短有影响. 所以, 为获得有较高残留酶活力和较长生物半衰期的修饰酶, 选择适当的修饰剂浓度至关重要.

2.2 修饰酶的分离纯化

图 1 中主峰为酶活性峰, 其位置较未修饰酶洗脱峰前移, 并与其他峰明显分离, 表明 Sephadex G75 柱能够很好将修饰酶与其他杂质分开.

2.3 修饰酶的结构变化

图 2 为 rh Cu/Zn SOD 修饰前后的圆二色谱 (CD 谱) 图谱显示, rh Cu/Zn SOD 是以 β 折叠为主要结构的蛋白质, 与文献 [6] 报道一致. 根据图 2a, b 两图谱的相似性可以认为, 在修饰前后 rh Cu/Zn SOD 的主链结构变化不大.

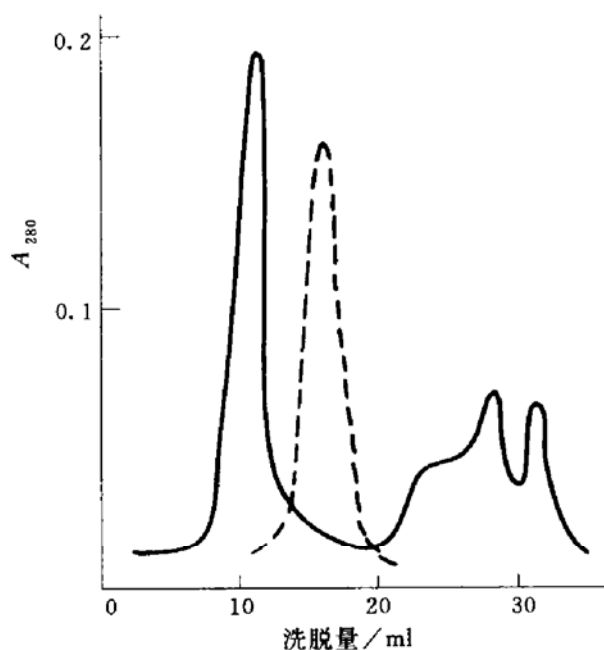


图1 SMA-rh Cu/Zn SOD 的 Sephadex G75 凝胶层析图谱

柱大小: 1cm × 40cm; 洗脱液: pH 7.4, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 ; 流速: 1.0 ml/h; — SMA-rh Cu/Zn SOD, ---- rh Cu/Zn SOD.

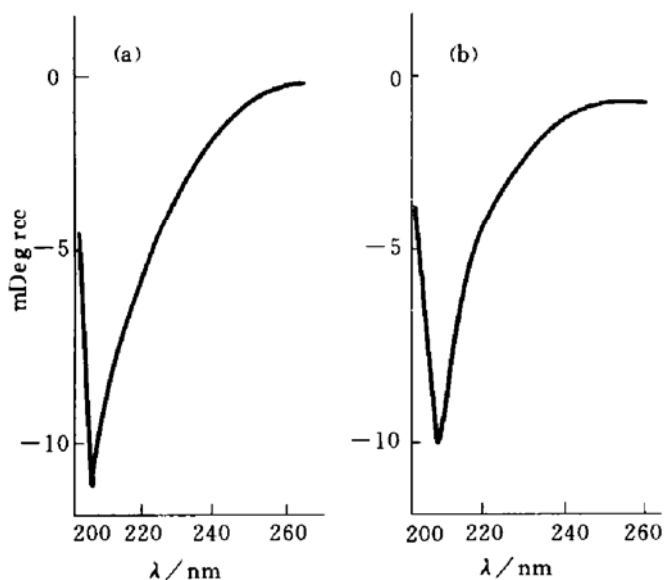


图2 rh Cu/Zn SOD 与 SMA-rh Cu/Zn SOD 的圆二色谱

(a) rh Cu/Zn SOD; (b) SMA-rh Cu/Zn SOD.

2.4 修饰酶的抗蛋白水解酶能力

rh Cu/Zn SOD 修饰前后的胃蛋白酶、胰蛋白酶水解实验结果如图 3。作用 60min 后, 修饰酶的残留酶活力分别为 83% 和 79%, 而未修饰酶的残留酶活力均低于 70%。修饰酶抗

蛋白水解酶能力的增强可能是由于修饰剂的亲水性质所致。亲水性的 SMA 在酶分子表面形成溶剂化层, 使酶解位点受到屏蔽。

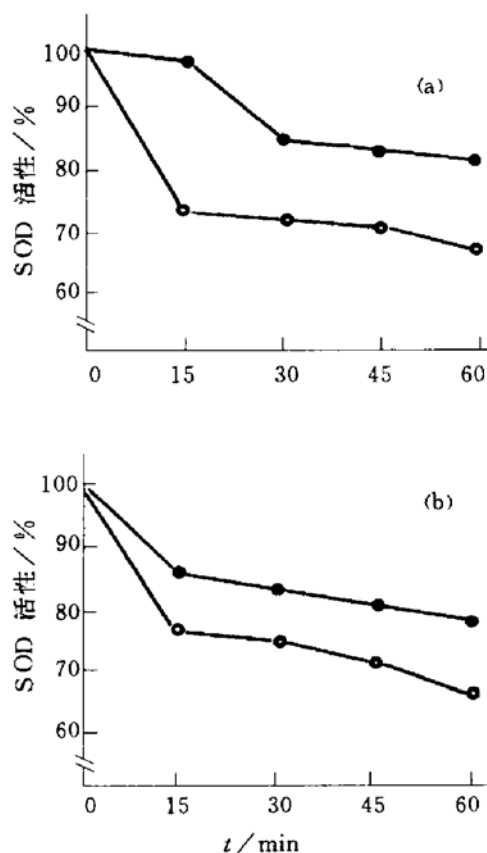


图3 rh Cu/Zn SOD 和 SMA-rh Cu/Zn SOD 对胃蛋白酶及胰蛋白酶的抵抗能力
(a) 胃蛋白酶; (b) 胰蛋白酶。
○—○ rh Cu/Zn SOD, ●—● SMA-rh Cu/Zn SOD.

2.5 修饰酶的生物半衰期

大鼠实验测得修饰酶的生物半衰期为 $3\frac{2}{3}$ h, 为修饰前的 22 倍。有文献报道^[3], 用 SMA 为修饰剂所得修饰酶的生物半衰期为 6h, 本文所用酶的来源及修饰程度均与文献报道不同, 这些因素可能是导致生物半衰期长短差别的主要原因。

本文所得修饰酶 SMA-rh Cu/Zn SOD, 国内外尚未见报道。该修饰酶的制备方法简便、流程短, 所得产品具有较高的残留酶活力和较强的抗蛋白水解酶能力, 并延长生物半衰期 22 倍。目前正在进行动物实验以观察其对某些疾病的疗效。

参 考 文 献

- 1 饶欣欣, 王惠媛, 吴小林等. 生化药物杂志, 1991; 1: 21
- 2 Maeda H, Ueda M, Morinaga T *et al.* J Med Chem, 1985; 28: 455
- 3 Ogino T, Inoue M, Ando Y *et al.* Int J Peptide Protein

Res, 1988; 32: 153

- 4 Misra H P, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1977; 181: 308
- 5 Snyder S L, Sobocinski P Z. Anal Biochem, 1975; 64: 284
- 6 Brahms S, Brahms J. J Mol Biol, 1980; 138: 149

芽孢杆菌 O 74 碱性纤维素酶的 纯化和性质研究

王 冬 宋桂经 高培基

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘要 对芽孢杆菌 (*Bacillus*) O74 菌株产生的纤维素酶经过 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25 和疏水相互作用 Agarose 4B 三种层析方法, 分离纯化到一个仅具有内切 β -葡聚糖酶 (CMC 酶) 活性的纯组分. 提纯后酶的比活力提高了 27.9 倍, 总回收率为 40%. 分子量和等电位点分别为 52 500 和 4.1. 酶在 pH 4—12 范围内均具有较高活性. 其最适反应温度为 50℃, 最适反应 pH 为 7.0, 属于反应 pH 范围较广泛的耐碱性纤维素酶. 除 Hg^+ , Ag^+ , Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 等少数离子及少数表面活性剂、助剂对酶活性有一定影响外, 酶活性相当稳定, 符合洗涤剂用酶的条件.

关键词 分离纯化, 纤维素酶, 碱性

大多数真菌、细菌产生的纤维素酶一般只能在中性偏酸性范围内发挥作用, 对这一类酶的分离、纯化和性质研究, 现已取得了重大进展. 近年来, 产碱性纤维素酶的微生物菌种选育和酶的工业化应用工作越来越引起人们的重视^[1]. 特别是将碱性纤维素酶应用于洗涤剂中, 国外已达产业化水平, 使加酶洗涤剂增加了新品种. 这其中被选为生产用菌种的微生物一般为耐碱性细菌, 其生长条件不象嗜碱性细菌那样严格, 所合成的耐碱性酶除在 pH 9 以上具有酶活外, 在中性及弱酸性环境下也能保持相当活性, 从而使酶的适用范围更广泛. 对于这一类微生物及酶性质的研究, 国外已做了一定的工作^[2], 国内尚未见正式报道. 我们曾分离得到一株产碱性纤维素酶的芽孢杆菌 *Bacillus* O74, 其在较好发酵条件下的酶活性水平高于国外文献报道的菌株^[1,3]. 本文对该

菌株合成的耐碱性纤维素酶进行了纯化, 并进行了酶学性质研究. 为将来实际应用的需要, 特对其在有洗涤剂成分存在条件下的性质进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 粗酶液 将经过 3000r/min 离心所得芽孢杆菌 *Bacillus* O 74 发酵液上清, 加入 3 倍体积的冷无水乙醇, 充分沉淀后, 再经 3000r/min 离心, 将所得沉淀自然风干. 需要时, 加入 pH 6.8 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液至原发酵液体积, 溶解沉淀, 即得粗酶液.

1.1.2 层析用凝胶 Sephadex G-100,

Preparation and Properties of Long Half-Life Recombinant Human Superoxide Dismutase.

Luo Xunyi, Wang Jingyi, Xie Bangtie, Li Zhanqing, Liu Xiaolin, Chen Xiaosui. (*Laboratory of Molecular Biology, Naval General Hospital, Beijing 100037*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 234

Recombinant human Cu/Zn SOD (rhCu/Zn SOD) obtained from *E. coli* was covalently linked with an amphipathic molecule poly-(styrene-co-maleic acid) butyl ester (SMA) via amide linkage. When 42% free amino groups of the enzyme were modified, 88% remained enzyme activity was obtained. The results of circular dichroism of rhCu/Zn SOD and SMA-rhCu/Zn SOD indicated that the structure of the modified rhCu/Zn SOD was scarcely changed. Its biological half-life in blood was prolonged 22 times, and its abilities to resist pepsin and trypsin were increased significantly.

Key words rhCu/Zn SOD, chemical modification of protein, SMA, genetic engineering

Purification and Properties of the Alkaline CMCase Derived from *Bacillus sp.* O74.

Wang Dong, Song Guijing, Gao Peiji. (*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 237

An alkaline CMCase was partially purified from the culture medium of *Bacillus sp.* O74. The enzyme was purified 27.9 fold by sephadex G-100 gel filtration, ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The enzyme was characterized by demonstration of optimum activity at 50 °C and pH 7.0, and its molecular weight of 52 500 determined by gel filtration. The pH range of the enzyme showing the activity is

from pH 4 to 12, and at pH 9 and 10, it can keep 80% and 70% of the maximum activity respectively. The enzyme was stable in the presence of the most metal ions, surface active agents and auxiliaries.

Key words purification, cellulase, alkaline

Extraction of DNA From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues for the Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement.

Zhang Jianzhong, Zhu Yuanxiao, Wang Jianan, Zheng Jianqiang. (*Department of Pathology, Kegongwei Hospital, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 241

Gene rearrangement analysis plays an increasing important role in the diagnosis of lymphomas. The possibility of detecting immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was examined. 30 cases of lymphoid lesions, only 11 have been extracted with high molecular DNA which could be used in southern blot, and others showed DNA degradation in some degree. The degraded DNA could also be used in antigen receptor gene analysis after amplified by polymerase chain reaction. DNA analysis using paraffin-embedded tissues has potential clinical and research applications in detecting gene abnormalities in rare and difficult cases of lymphomas in which fresh specimen was not available.

Key words paraffin-embedded tissues, extraction of DNA, gene rearrangement analysis, lymphoma

Amplification, Cloning and Identification of Full-Length Coding Sequence for Human Myelin Basic Protein. Chen Junjie, Wang Ruohan, Cheng Hanhua, Chen Pu, Li Changlong.