

进行实验的. 本文建立的核酸探针传感器的特点是将单链 DNA 直接固化在压电晶体上, 无需用放射性同位素或非放射性物质标记, 显示了一定的优越性.

此外, 能否使单链 DNA 较多并牢固地结合于压电晶体上, 也是核酸探针传感器的关键, 我们采用台湾吴宗正等的方法^[1]并略加修改获得了能将约 50% DNA 固定于晶体表面的良好结果, 说明 1 μg 目的 DNA 对于核酸探针传感器的构建是足够的. 固化有单链 DNA 的压电晶体杂交后尚可经变性再生, 而并不影响 DNA 与晶体的交联程度, 这不仅为核酸探针传感器实用化奠定了基础, 也为基因分离提供了一定资料.

稳定性也是影响此技术测定的主要因素之一. 在测量过程中由于受诸多因素的影响, 会产生不稳定性、频率发生漂移, 从而影响测量的准确性. 本实验采用了参比差动测量的方法, 用晶振 XTAL1 作为参比传感器, XTAL2 为核酸传感器, 传感器基体的材料是完全相同的, 从而受影响的变化也是相同的, 所以在测量中其不稳定因素被减小到最低程度, 理论上可忽略不计. 但实际测量中仍有漂移 (25 $^{\circ}\text{C}$, 24 h $\pm$ 2 Hz), 特别是测量误差达 $\pm$ 10 Hz, 致使我们将 Δf 变化超过 10 Hz 者才定为阳性结果, 这尚需进一步完善.

参 考 文 献

- 1 吴宗正, 王西华, 欧乐君. 中华民国微生物杂志, 1990; 23: 147

- 2 Graham C R, Leslie D, Squirrell D J. Biosensors and Bioelectronics, 1992; 7 (7): 487
- 3 Millan K M, Mikkelsen S R. Anal Chem, 1993; 65 (7): 2317
- 4 Millan K M, Saraullo A, Mikkelsen S R. Anal Chem, 1994; 66 (18): 2943
- 5 陈誉华, 洪文廉, 陈庆学等. 中国公共卫生学报, 1991; 10 (4): 248
- 6 陈誉华, 刘 军, 陈庆学等. 中国医科大学学报, 1993; 21 (增刊): 12
- 7 宋艾芝, 赵玉坤, 刘 军等. 中华儿科杂志, 1992; 30 (1): 14
- 8 Vonsover A, Leventon-Kriss S, Langer A *et al.* J Med Virol 1987; 21 (1): 57
- 9 侯云德主编. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 160~164
- 10 Sauerbrey G A. Anal Chem, 1983; 55: 1682

Study on Nucleic Acid Probe Sensor. .Chen Yuhua, Song Jindan, Li Dawei (Key Laboratory of Cell Biology, China Medical University, Ministry of Public Health of China, Shenyang 110001, China).

Abstract A new nucleic acid hybridizing assay, piezoelectric quartz-sensor which is capable of quantitative analysis has been established on the basis that the frequency of piezoelectric quartz vibration is the function to its surface sediment. The technique is simple, specific and sensitive up to 100 pg. It uses the rapid, sensitive frequency messages as the demonstration system of nucleic acid hybridization.

Key words nucleic acid hybridization, biosensor, piezoelectric quartz

胸腺腺苷脱氨酶免疫亲和纯化和性质研究*

罗时文 李金生 沈静娴 邹国林¹⁾

(江西医学院生物化学教研室, 南昌 330006)

摘要 用免疫亲和层析结合常规生化方法从人胸腺中纯化腺苷脱氨酶达电泳纯, 比活力 14898 U/mg,

*江西省自然科学基金资助项目. ¹⁾武汉大学生命科学学院.

收稿日期: 1995-12-04, 修回日期: 1996-05-14

得率 34.15%。该酶分子质量为 41.3 ku, 约由 380 个氨基酸残基构成, 等电点为 4.9, 最适温度 37~40℃, 最适 pH 为 7.0。以腺苷或 2-脱氧腺苷为底物, 其 K_m 分别为 83 $\mu\text{mol/L}$ 和 61 $\mu\text{mol/L}$ 。对氯汞苯甲酸能显著抑制酶活性, 二硫苏糖醇可使被抑制的活性得到部分恢复。

关键词 腺苷脱氨酶, 免疫亲和纯化, 性质, 人胸腺

自 Giblett^[1]发现腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, EC 3.5.4.4., ADA) 缺陷导致重症联合免疫缺陷病 (SCID) 以来, 国外对 ADA 进行了大量研究, 现已证实 ADA 主要功能是调节体内腺苷尤其是 2-脱氧腺苷的浓度, 与细胞增殖、神经活动及血流调控密切相关, 是 T 淋巴细胞分化成熟的依赖性酶^[2]。给 SCID 患者输入 ADA 或导入 ADA 基因可重建患者的免疫功能^[3,4]。Chechik^[5]证实人胸腺白血病相关抗原 (human thymus-leukemia associated antigen, HThy-L) 就是 ADA。国内 ADA 研究主要集中在临床检测方面, 对其分子性质的研究报道甚少。本研究用免疫亲和层析法从人胸腺中分离纯化出 ADA, 研究了其酶学性质。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

从死亡 4 h 之内 1~12 岁儿童尸体解剖获胸腺, -40℃ 冰箱保存, 2 个月内使用。硝酸纤维素膜 (NC 膜, 孔径 0.2 μm), 牛肠 ADA, 核苷磷酸化酶 (NP), 溴化-3, (4, 5-二甲基-2-噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑 (MTT), 2-脱氧腺苷, 对氯汞苯甲酸 (PCMB) 为 Sigma 公司产品; CNBr-Sepharose 4B、Sephadex G-100 和 G-200 为 Pharmacia 公司产品; 腺苷为 Boehringer 公司产品; 巯基乙醇为 Merck 公司产品; SDS、二硫苏糖醇 (DTT) 为 Serva 公司产品; SDS-PAGE 标准蛋白、黄嘌呤氧化酶为东风试剂公司产品; 其他试剂为国产分析纯。新西兰家白兔购自江西省实验动物中心。人胃 ADA、人胃癌 ADA、抗牛 ADA IgG 为本室制备^[6]。

1.2 方法

1.2.1 人胸腺 ADA 抗原的制备: 取 20 g 胸腺

加 100 ml 酶提取液 (pH 7.4, 0.01 mol/L PBS, 0.001 mol/L 巯基乙醇, 0.001 mol/L EDTA, 0.25 mol/L 蔗糖) 进行匀浆, 4℃ 32 000 g 离心 40 min 去沉淀, 上清液用 35%~65% 饱和度硫酸铵沉淀 ADA, 透析, PAGE 分离, NC 膜印迹^[7], 活性染色定位^[8], 剪下活性带, 测蛋白质含量, 待用。

1.2.2 抗人胸腺 ADA 抗体制备: 参照 Coghlan^[9]方法进行, 具体操作如下: 静脉麻醉家兔, 在腹股沟、腋窝、背部纵向切开皮肤, 将印迹有 ADA 的 NC 膜卷成烟卷状包埋于皮下, 每次 100 μg , 10 d 一次共 8 次, 双扩试验抗体滴度达 1:32 时颈动脉放血获抗血清, 分离 IgG。将 260 mg IgG 与 CNBr-Sepharose 4B 以 10 g/L 胶交联, 结合率为 99.1%, 用 pH 7.4, 0.01 mol/L PBS (含 0.001 mol/L 巯基乙醇) 平衡, 置 4℃ 冰箱备用。

1.2.3 ADA 的分离纯化: 全部操作均在 4℃ 条件下进行。取 90 g 胸腺加 400 ml 酶提取液置电动匀浆机 16 000 r/min 匀浆, 30 s/次共 8 次, 32 000 g 离心 60 min 去沉淀, 35%~65% 饱和度硫酸铵沉淀 ADA, 离心收集沉淀, 用 pH 7.4 0.01 mol/L PBS (含 0.001 mol/L 巯基乙醇) 透析, 分二次与上述亲和试剂混合吸附 ADA, 然后将吸附了 ADA 的 CNBr-Sepharose 4B 凝胶装入 1 cm $\times$ 35 cm 层析柱中, 用缓冲液洗至 $A_{280} < 0.02$, 以 90 ml 4 mol/L 尿素 (缓冲液配制) 洗脱 ADA (图 1a), 合并酶活力峰, 迅速透析去除尿素, 浓缩后上 Sephadex G-100 柱 (1 cm $\times$ 100 cm) (图 1b) 得纯酶。

1.2.4 酶活性测定: 采用测氮法^[10], 以每毫升样品 37℃ 作用于腺苷 60 min 产生氮氮的微克数作为酶的活性单位 (U/ml)。

1.2.5 蛋白质含量测定: 采用考马斯亮蓝染

料法^[11]. 用牛血清白蛋白作标准.

1.2.6 电泳检测蛋白纯度: a. 不连续 pH 梯度 PAGE, 2.5% 浓缩胶, 7.5% 分离胶, 蛋白染色用考马斯亮蓝 R-250, 酶活性染色法为本

室参照 Spencer 的原理并加以改进^[8]. b. SDS-PAGE, 凝胶浓度 10%, SDS 浓度为 0.1%. c. 等电聚焦电泳, Ampholine 的 pH 范围为 3~10, 凝胶浓度 7.5%.

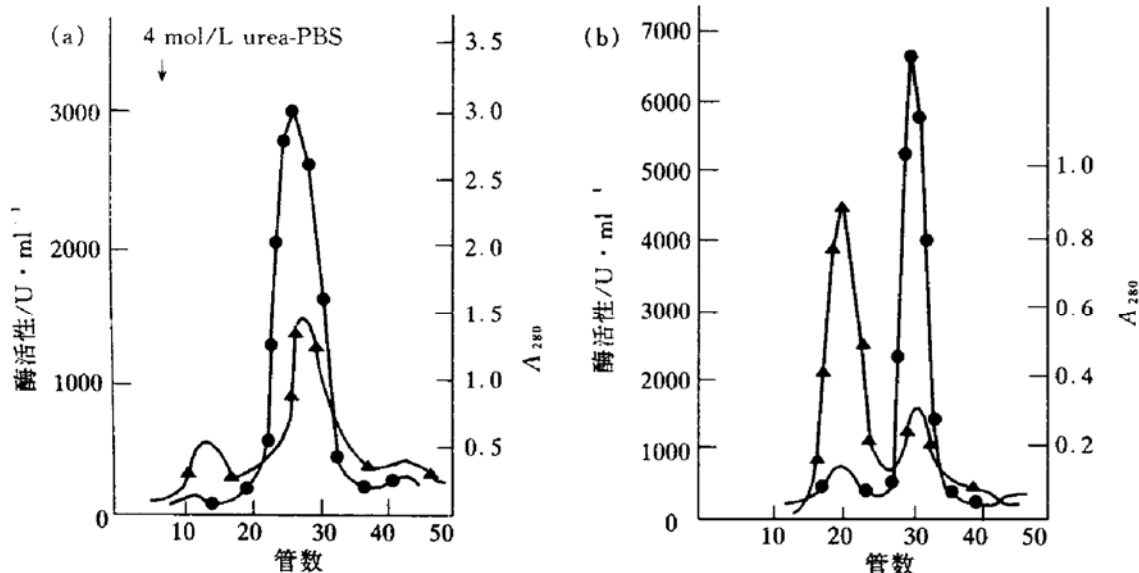


图1 胸腺 ADA 层析纯化

(a) 抗 ADA IgG-Sepharose 4B 亲和层析. 层析柱: 1 cm×35 cm, 流速: 12 ml/h, 2 ml/管; (b) Sephadex G-100 分子筛层析. 层析柱: 1 cm×100 cm, 流速: 12 ml/h, 2 ml/管. ●—●: 酶活性; ▲—▲: A_{280} .

1.2.7 氨基酸组成分析: 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析. 色氨酸残基测定采用对二甲氨基苯甲醛法 (DAB 法)^[12].

1.2.8 K_m : 以不同浓度腺苷或 2-脱氧腺苷 (0.0125~0.5 mmol/L) 为底物, 精确保温 10 min 测酶活性^[10], 用最小二乘法根据米氏

方程计算 K_m .

2 结 果

2.1 纯化结果与鉴定

2.1.1 纯化结果: 见表 1.

2.1.2 酶的鉴定: 纯化的 ADA 经 PAGE 后进

表1 人胸腺 ADA 纯化结果

步 骤	总体积 /ml	总活力 /U	总蛋白 /mg	比活性 /U·mg ⁻¹	纯化倍数	回收率 /%
粗酶液	442	106875	18264.53	5.85	1	100
35%~60% (NH ₄) ₂ SO ₄	83	79849	3214.61	24.84	4.25	74.71
免疫亲和层析	16.4	51271	32.73	1566.48	267.77	47.97
Sephadex G-100	7.8	36500	2.45	14898.0	2546.67	34.15

行蛋白染色和活性染色均呈现为一条带, 且蛋白染色带与活性染色带相对应 (图 2), 说明酶已达电泳纯. 下述的 SDS-PAGE、等电聚焦电

泳结果也说明酶达均一程度. 若将 ADA 活性染色液中腺苷用 2-脱氧腺苷替代, 染色谱带不变, 说明纯化的酶为 ADA 而非其他的酶或蛋

白质.



图2 胸腺 ADA 不连续 pH 梯度
聚丙烯酰胺凝胶电泳
A: 蛋白染色; B: 活性染色.

酶的分子质量为 41.3 ku (图 4a), 可见酶由一条多肽链构成. 等电聚焦电泳该酶表现为一条带, 测得其等电点为 4.9 (图 4b).

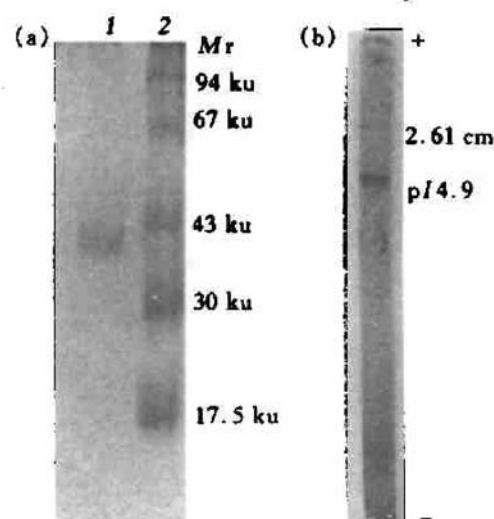


图4 ADA 分子质量及等电点

(a) SDS-PAGE (10% 凝胶, 0.1% SDS). 1: 样品 (20 μ g); 2: 标准蛋白. (b) 等电聚焦电泳 (加样 10 μ g, 凝胶浓度 7.5%, 胶长 9 cm, 500 V, 9 h).

2.2 酶的性质

2.2.1 分子质量及等电点: Sephadex G-200 凝胶柱 (1 cm $\times$ 100 cm) 层析测得纯酶的分子质量为 39.4 ku (图 3). SDS-PAGE 法测得该

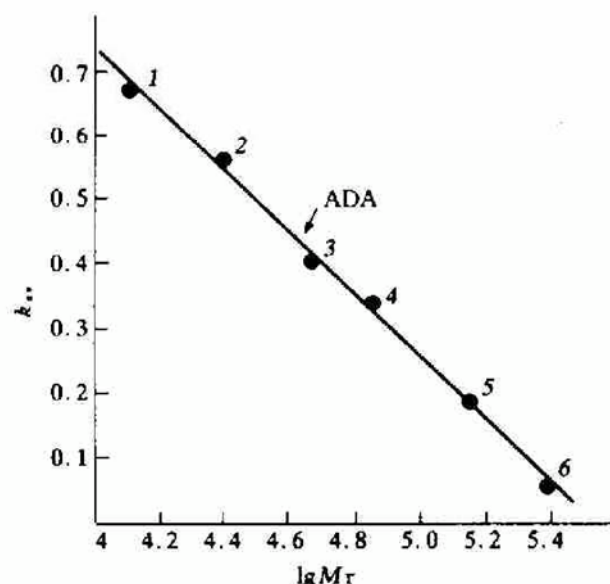


图3 Sephadex G-200 凝胶过滤法测 ADA 分子质量
层析柱: 1 cm $\times$ 100 cm, 流速: 10 ml/h, 2 ml/管. 1: 马心细胞色素 C (12.5 ku); 2: 牛胰蛋白酶 (23.3 ku); 3: 卵清蛋白 (45 ku); 4: 牛血清白蛋白 (67 ku); 5: 乳酸脱氢酶 (140 ku); 6: 牛肝过氧化氢酶 (247.5 ku).

2.2.2 氨基酸组成分析: 结果见表 2.

表2 人胸腺 ADA 氨基酸组成¹⁾

氨基酸	氨基酸摩尔分数	氨基酸残基/mol
Asx	36.5	37
Thr	20.3	20
Ser	19.7	20
Glx	50.6	51
Gly	26.8	27
Ala	32.2	32
Cys	2.0	2
Val	25.9	26
Met	2.5	3
Ile	17.0	17
Leu	37.5	38
Tyr	6.8	7
Phe	14.4	14
Lys	26.9	27
His	7.6	8
Arg	19.1	19
Pro	27.7	28
Trp	4.4 ²⁾	4

¹⁾根据 SDS-PAGE 测定的分子质量 41340 计算; ²⁾Trp 测定采用 DAB 法^[12].

2.2.3 最适 pH 和酸碱稳定性: 在不同 pH 条件下测酶活性, 作 pH-酶活性曲线 (图 5a), 酶的最适 pH 为 7.0. 将酶分别置于不同 pH 缓冲液中, 4℃ 放置 24 h, 然后在 pH6.5 条件下测酶活性 (图 5b), 酶在 pH 4.5~9 范围内有较好的稳定性, 活性保持 70% 以上.

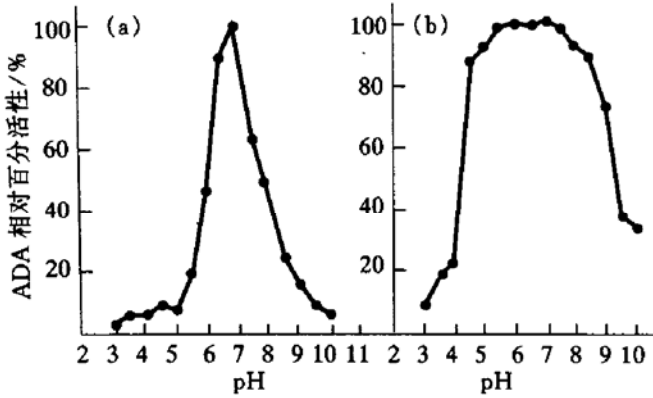


图 5 ADA pH-酶活性曲线

(a)pH 对酶活性的影响;(b)pH 对酶稳定性的影响.

2.2.4 最适温度和热稳定性: 在不同温度下测酶活性, 作温度-酶活性曲线 (图 6a), 酶的最适温度为 37~40℃. 将酶置于 37~50℃ 分别保温 30 min 至 4 h, 迅速冷却至室温, 然后在 37℃, pH 6.5, 50 mmol/L PBS 条件下测活性 (图 6b), 50℃ 30 min 酶失活 52%, 表明酶的热稳定性较差.

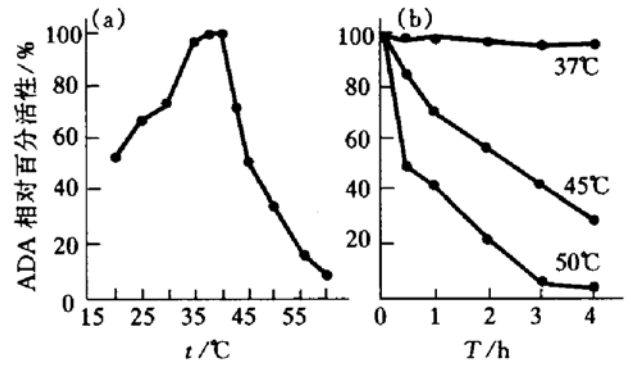


图 6 ADA 温度-酶活性曲线

(a)温度对酶活性的影响;(b)温度对酶稳定性的影响.

2.2.5 K_m : 改变底物浓度 (酶反应体系中底物的最终浓度分别为 0.0125, 0.0167, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L), 每管加入 10 U 纯酶, 37℃ 作用 10 min, 以每分钟产 NH_3 的微摩尔数表示反应速度, 用最小二乘法根据米氏方程求 K_m . 以腺苷为底物酶的 K_m 值为 83 $\mu\text{mol/L}$; 以 2-脱氧腺苷为底物酶的 K_m 为 61 $\mu\text{mol/L}$.

2.2.6 PCMB 和 DTT 对酶活性的影响: 在纯酶中分别加入不同浓度的 PCMB, 37℃ 保温 60 min 后测酶活性, 结果显示 PCMB 强烈抑制酶活性, DTT 可使被抑制的酶活性得到部分恢复 (表 3). 可见, 巯基是该酶活性中心的必需基团.

表 3 PCMB 和 DTT 对 ADA 活性的影响

PCMB 浓度 /mmol·L ⁻¹	相对百分活性			
	PCMB 处理	PCMB + 4 mmol/L DTT 处理	PCMB + 8 mmol/L DTT 处理	PCMB + 12 mmol/L DTT 处理
0.5	61.4	87.2	92.1	90.5
1.0	48.0	74.3	82.4	83.5
1.5	37.2	52.6	60.2	74.2
2.0	29.3	42.7	57.1	60.3
2.5	27.5	41.2	50.3	54.6
3.0	17.9	38.5	46.5	57.2
3.5	20.1	35.3	39.4	54.1
4.0	12.8	31.4	41.6	46.3

2.2.7 免疫沉淀试验: 将酶与不同浓度抗牛 ADA IgG 和抗人胸腺 ADA IgG 37℃ 孵育 1 h, 加 2% Sepharose protein A 悬液, 混匀, 放置

30 min 后离心取上清测活性, 可见上清液中 ADA 活性逐渐降低 (图 7). 将抗牛 ADA IgG 与人胸腺 ADA 和人胃 ADA、人胃癌 ADA

(本室提供) 进行免疫双扩散试验 (图 8), 结果表明人胸腺 ADA 和人胃 ADA、人胃癌 ADA、牛 ADA 有相同的抗原性。

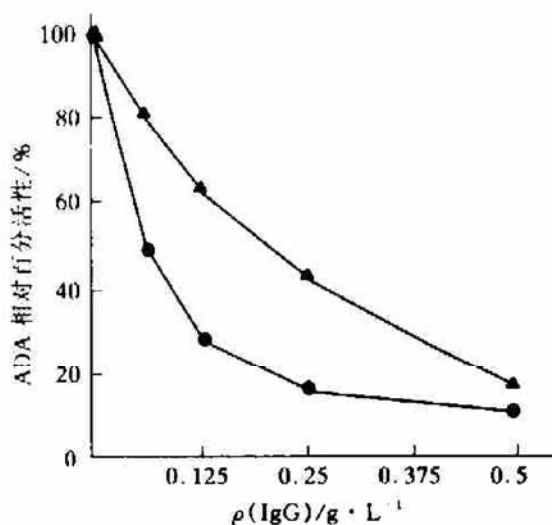


图 7 ADA 抗体对 ADA 活性的沉淀作用

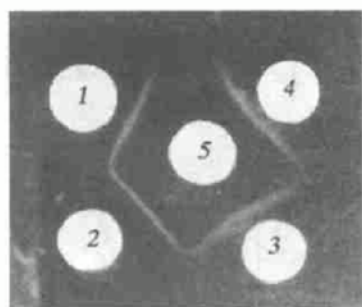


图 8 ADA 与抗 ADA IgG 的免疫双扩散试验

1: 人胃 ADA (1 g/L); 2: 人胃癌 ADA (1 g/L); 3: 人胸腺 ADA (1 g/L); 4: 牛 ADA (1 g/L); 5: 抗牛 ADA IgG (1 g/L)。

3 讨 论

ADA 体内分布广泛, 以胸腺细胞中活性最高。研究证实: ADA 活性降低将导致胞内脱氧腺苷积聚, 进而在脱氧腺苷激酶的作用下转化为 dATP, 抑制核苷酸还原酶使所有的核苷酸分解还原为脱氧核苷酸, DNA 合成受阻; 此外聚集的腺苷和脱氧腺苷还会抑制 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶, 使 S-腺苷同型半胱氨酸增多, 抑制甲基转移反应, 进一步抑制 DNA 合成。因此处于旺盛增殖状态的细胞必须具备

较高 ADA 活性^[2]。ADA 抑制剂 2-脱氧助间型霉素 (2-deoxycoformycin, DCF) 作为一种选择性抗肿瘤药物用于白血病的治疗显示出较好的疗效^[13]。Trotta^[14]认为可以从 ADA 抑制剂角度去设计, 筛选抗肿瘤药物。

据报道^[15]体内 ADA 有二种主要分子形式: 小分子 ADA (36~45 ku) 具有催化活性, 以单基因位点定位在 20 号染色体长臂上; 大分子 ADA (280~300 ku) 由二个小分子 ADA 和一种不具催化活性的蛋白质 (ADA 结合蛋白, 约 200 ku) 形成的复合物。体内 ADA 分布有组织差异, 胸腺、胃、脾、小肠以小分子 ADA 为主, 肾、肺、肝等组织以大分子 ADA 为主。现已完成小分子 ADA 基因的全序列分析, 通过 cDNA 预测小分子 ADA 的分子质量为 40638^[16]。本研究结果表明从人胸腺中所纯化的 ADA 为由一条多肽链构成的小分子 ADA, 其分子质量、等电点、氨基酸组成, 以腺苷为底物的 K_m 值与从人红细胞^[15]、人白血病粒细胞^[17]、人结肠及结肠癌组织^[14]中纯化的 ADA 近似, 并与通过 ADA cDNA 序列预测的氨基酸组成^[18]接近。本文研究结果还证实, 该酶富含酸性氨基酸, 与人体其他组织来源的 ADA 有相似抗原性, 巯基为酶活性中心必需基因。

在纯化 ADA 的众多方法中, 亲和层析法以其纯化效果好, 得率高而被广泛采用。其中有底物亲和层析法^[17], 抗牛 ADA 多克隆抗体亲和层析法^[15]和单克隆抗体亲和层析法^[16]等。本文采用印迹有人胸腺 ADA 的硝酸纤维素膜皮下包埋法制备抗体, 此法有以下优点: a. 直接以所要纯化的酶蛋白为抗原, 所获抗体亲和力高。b. 利用硝纤膜使被吸附抗原持续缓慢释放以及作为异物存在于动物体内的硝纤膜对淋巴细胞的趋化作用, 省去了福氏完全佐剂。c. 分离抗原步骤简单。对照实验^[6]表明产生相同滴度抗体, 本法所用抗原量仅为佐剂法的 1/2~1/3; 采用此亲和层析法纯化人胸腺 ADA 得率高于牛 ADA 多克隆抗体亲和层析法, 与单克隆抗体亲和层析法^[16]接近。由于

无需用福氏完全佐剂, 因而避免了福氏完全佐剂可能引起的杂抗体出现. 该法对抗原纯度要求不高, 简便易行, 适用性强.

参 考 文 献

- 1 Gille E R, Anderson J E, Cohen F *et al.* Lancet, 1972; 2: 1067
- 2 Geiger J D, Padua R A, Nagy J I. In: Phillis J W ed. Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991: 71
- 3 Hershfield M S, Buckley R H, Greenberg M L *et al.* N Engl J Med, 1987; 316: 589
- 4 Anderson W F. Science, 1992; 256: 808
- 5 Chechik B E, Schrader W P, Daddona P E. J Natl Cancer Inst, 1980; 64 (5): 1077
- 6 沈静娴, 罗时文, 李金生等. 生物化学杂志, 1996; 12 (4): 464
- 7 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76: 4350
- 8 罗时文, 邹国林, 沈静娴等. 江西医学院学报, 1996; 36 (2): 1
- 9 Coghlan L G, Hanausek M. J Immunol Methods, 1990; 129: 135
- 10 Bergmeyer H U. Methods of enzymatic analysis, 3rd ed. New York: Academic Press, 1984; IV: 308
- 11 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; 72: 248
- 12 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社. 1981: 60~61
- 13 Agarwal P P. Pharmac Ther, 1982; 17: 399
- 14 Trotta P P, Balis M E. Biochemistry, 1978; 17: 270
- 15 Daddona P E, Kelley W N. J Biol Chem, 1977; 252: 110
- 16 Phillips A V, Robbins D J, Coleman M S. Biochemistry, 1987; 26: 2893
- 17 Wiginton D A, Coleman M S, Hutton J J. Biochem J, 1981; 195: 389
- 18 Daddona P E, Kelley W N. J Biol Chem, 1984; 259: 12101

Immuno-affinity Purification and Some

Property Studies of Adenosine Deaminase from Human Thymus. Luo Shiwen, Li Jinsheng, Shen Jingxian, Zou Guolin (*Department of Biochemistry, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China*).

Abstract A simplified procedure for the purification of adenosine deaminase (ADA) from human thymus based on immuno-affinity chromatography of anti-human thymus ADA IgG was described. After ammonium sulfate fractionation, immuno-affinity chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. ADA was separated as homogeneity from human thymus. The yield and the specific activity of purified ADA were 34.15% and 14898 U/mg respectively. The purified ADA molecule consists of about 380 amino acid residues giving a Mr of 41.3 ku and pI of 4.9. The optimum temperature is 37~40°C. The optimum pH is 7.0. Using adenosine or 2-deoxyadenosine as substrate the apparent K_m of the enzyme is 83 $\mu\text{mol/L}$ and 61 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The enzyme activity can be inhibited by p-chloromercuric benzoic acid while partially restored by dithiothreitol. ADA activity was decreased by anti-calf ADA IgG and anti-thymus ADA IgG.

Key words adenosine deaminase, immuno-affinity chromatography, property, human thymus

静电作用与修饰铜锌超氧化物歧化酶的稳定性*

李维忠¹⁾ 缪方明

(天津师范大学晶体化学研究所, 天津 300074)

摘要 铜锌超氧化物歧化酶 (Cu, Zn-SOD) 表面的赖氨酸经化学修饰后, 酶的稳定性显著提高. 赖氨酸

*天津市高等教育局重点学科资助课题. ¹⁾南开大学化学系博士生.

收稿日期: 1996-01-23, 修回日期: 1996-05-22