

locus control region derivatives results in stable transmission of an active transcriptional structure. EMBO J, 1994, 13 (13): 3065 ~ 3076

- 4 Nakai H, Herzog R W, Hagstrom J N, *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. Blood, 1998, 91 (12): 4600~ 4607

Stable Integration of Genomic Gene of Interest in Mammalian Cells Following Adeno-associated Virus Vector Mediated Gene Transfer. LI Bin, LIU De-Pei, WANG Jing, DONG Wen-Ji, GUO Zhi-Chen, XIA Wei, LIANG Chieh-Chuan (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of*

Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract An adeno-associated viral vector containing erythroid enhancer (HS2), genomic β -globin gene and neomycin resistance gene was constructed, then packaged into recombinant AAV virions. Southern analyses showed that recombinant provirus genome steadily integrated into erythroid cells via virus transduction. It was suggested that an adeno-associated virus could mediate stable integration of genomic gene of interest in mammalian cells.

Key words adeno-associated virus vector, genome, gene of interest, gene transfer, integration

细菌 3-脱氧葡萄糖醛酮代谢酶的纯化及性质研究*

梁智群 粟桂娇 李湘萍 莫柏立 梁静娟

(广西大学工业测试实验中心, 南宁 530004)

摘要 细菌 *Bacillus* sp. 2 粗酶液通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离、Q Sepharose FF、Sephadex G-100(I)、Hydroxyapatite 和 Sephadex G-100(II) 柱层析分离, 纯化了一种以 NADPH 为辅酶的 3-脱氧葡萄糖醛酮 (3-DG) 代谢酶, 定性为 2-羰基醛还原酶。纯化酶的比活力为 63.75 U/mg, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上显示一条蛋白质带。该酶分子质量约为 32 ku, 酶反应最适 pH 约为 6.2, 在 pH 5~8, 温度 25~30℃ 之间酶保持稳定; 该酶对 3-DG 的 K_m 为 2.3 mmol/L。添加适量的 EDTA、巯基乙醇或二硫苏糖醇能明显提高酶的活性; 而碘乙酸、N-乙基顺丁烯二酰亚胺抑制酶的活性。

关键词 美拉德反应, 3-脱氧葡萄糖醛酮, 细菌, 还原酶, 纯化, 性质

学科分类号 Q554.2

3-脱氧葡萄糖醛酮 (简称 3-DG) 是美拉德反应的主要中间产物之一, 其代谢酶中的 2-羰基醛还原酶已被证实能在体外抑制美拉德反应的高级阶段^[1]。国外已有报道, 动植物体内存在抑制美拉德反应的代谢酶, Kato 等^[1~3] 在猪肝、鸡肝和欧芹中找到了对 3-DG 具有还原作用的酶, 但在微生物方面, 国内外均未见报道。我们已从细菌中筛选到对 3-DG 有强还原活性的菌株 *Bacillus* sp. 2^[4], 现进一步把其中主要的 3-DG 代谢酶分离纯化出来, 鉴定其生化特性。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *Bacillus* sp. 2 由本课题组筛选而得。3-DG 按日本 Kato 等的方法制备。NADPH 为 Sigma 公司产品, Q Sepharose FF 为 Pharmacia 原装柱, Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品, Hydroxyapatite 为 BIO-RAD 产品, TEMED 为 SERVA 产

品, 考马斯亮蓝 R-250 为 Fluka 进口分装产品, Arc、Bis、SDS、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 为华美公司进口分装产品, 低分子量标准蛋白为上海丽珠东风生物技术有限公司产品, 牛血清白蛋白 (电泳单点纯) 为上海长阳生化制药厂产品。其余均为国产分析纯试剂。LC-10AT 液相层析系统为岛津公司产品。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定: 酶活力测定参考文献 [3]。1 活力单位 (U) 定义为此测定条件下每分钟减少 1 μmol NADPH 所需的酶量。

1.2.2 蛋白质测定: 用 280 nm 下的吸光值跟踪柱层析流出的蛋白质峰。蛋白质的浓度参考 Lowry 法^[5]测定, 以牛血清白蛋白为标准制作标准曲线。

1.2.3 分子质量的测定: 采用电泳法和分子筛两种方法进行测定。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参考

* 国家自然科学基金 (29466012) 和广西科学基金资助项目。

Tel: (0771) 3233258, E-mail: xiangp@gxu.edu.cn

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-08-16

Weber 和 Osborn 的方法^[6]以及 Laemmli 法^[7]进行. 采用分离胶浓度 $T = 12.5\%$, 电泳条件为恒流 10 mA 1.5 h. 考马斯亮蓝 R250 染色 4 h 或过夜, 脱色处理后拍照. 同时采用 Macrophere GPC 分子筛柱 HPLC 色谱法测定, 作 $T_R\text{-lg}M$ 标准曲线, 从标准曲线上求得酶分子质量.

1.2.4 酶的提取: 菌种经扩大培养后, 将培养液离心 15 min (6 000 g , 4℃), 菌体经过 0.9% NaCl 洗涤两次后加入预冷的缓冲液 A 即 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (含 10 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.0), 置 -68℃ 超低温冰箱保存. 冰冻菌体解冻后用超声波破碎细胞 (功率 150 W, 1 min/次, 共 8 次), 细胞破碎液离心 15 min (9 000 g , 4℃), 取上清液即得粗酶液.

1.2.5 酶的分离纯化: 粗酶液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, 将 70%~100% 饱和度的沉淀溶于少量缓冲液 A 中, 经透析和 PEG 20 000 浓缩后上 Q Sepharose FF 柱 (2.6 cm $\times$ 10 cm), 用缓冲液 A

和缓冲液 A (含 800 mmol/L NaCl) 线性梯度洗脱, 测定 A_{280} 和酶活力. 收集的主要酶活力部分对缓冲液 A 透析, 超滤浓缩后上 Sephadex G-100 柱 (2.0 cm $\times$ 85 cm), 用缓冲液 A (含 100 mmol/L NaCl) 洗脱, 收集酶活力部分, 透析超滤浓缩后上 Hydroxyapatite 柱 (1.6 cm $\times$ 20cm), 用缓冲液 A 和 500 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (含 10 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.0) 线性梯度洗脱, 收集酶活力部分. 超滤浓缩再上 Sephadex G-100 柱 (2.0 cm $\times$ 85cm), 用缓冲液 A (含 100 mmol/L NaCl) 洗脱, 收集酶活力部分, 透析超滤浓缩后用电泳法检测酶的纯度.

2 结 果

2.1 酶的分离纯化

细菌 *Bacillus* sp. 2 酶粗提液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Q Sepharose FF、Sephadex G-100 (I)、Hydroxyapatite 柱和 Sephadex G-100 (II) 柱层析分离纯化 (图 1), 酶的比活提高 167.8 倍, 活力

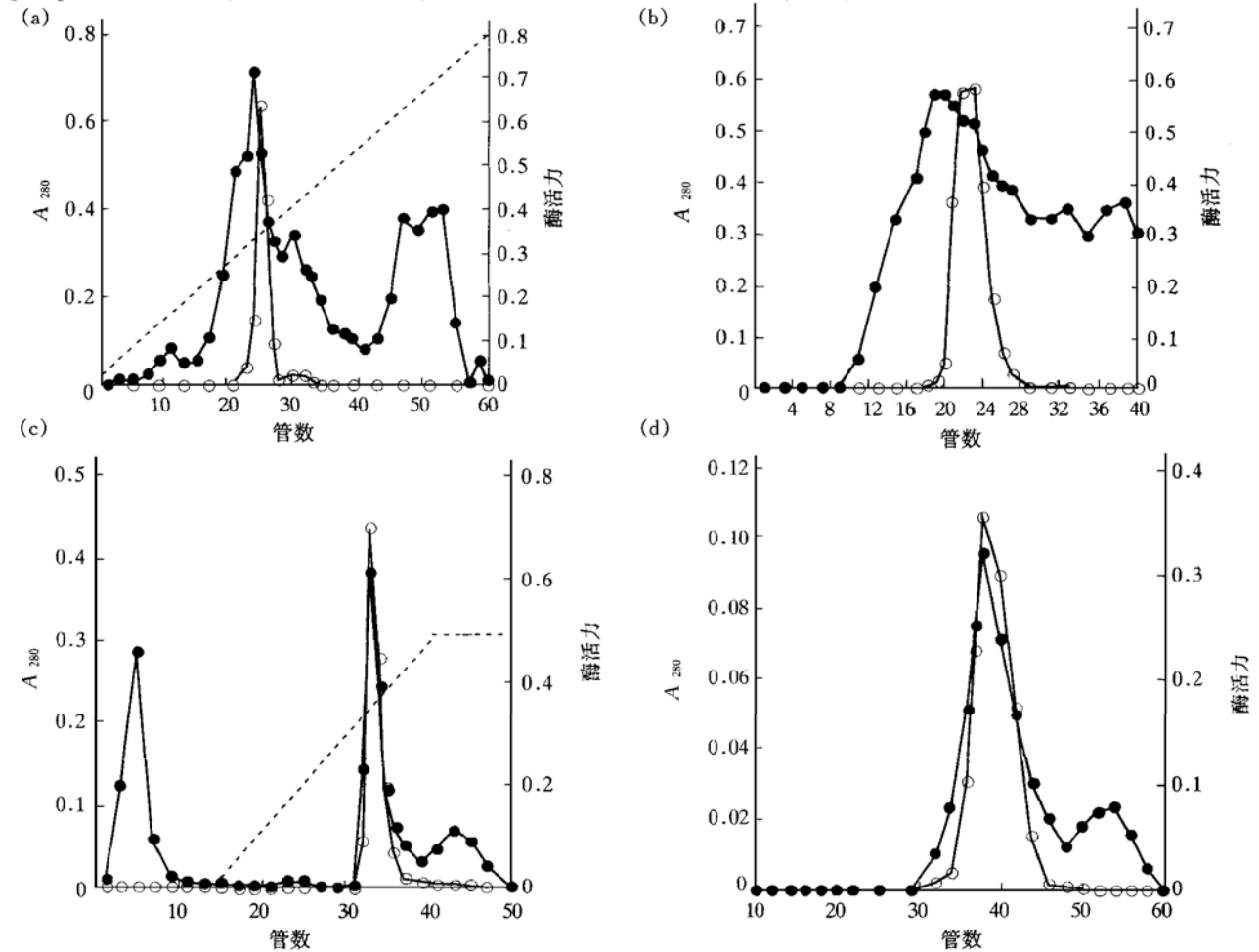


图 1 粗酶液柱层析分离纯化洗脱曲线
(a) Q Sepharose FF 柱洗脱; (b) Sephadex G-100 (I) 柱洗脱; (c) Hydroxyapatite 柱洗脱; (d) Sephadex G-100 (II) 柱洗脱. ●—●: A_{280} ; ○—○: 酶活力 (以 0.1 ml 酶液每分钟反应产生的 ΔA_{340} 表示); - - - : 洗脱梯度.

回收为 11.3% (表 1). 酶纯化各阶段的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图参见图 2. 纯化的 3-DG 代谢酶

经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 显示一条蛋白质带.

表 1 酶分离纯化各阶段纯化情况

	总蛋白/mg	总酶活/U	比活/U·mg ⁻¹	纯化倍数	活力回收/%
粗酶液	352.9	135.5	0.38	1	100
70%~100% (NH ₄) ₂ SO ₄ 部分	124.6	98.9	0.79	2.1	73.0
Q Sepharose FF	9.94	37.3	3.75	9.9	27.5
Sephadex G-100 (I)	3.67	36.8	10.03	26.4	27.2
Hydroxyapatite	0.64	19.6	30.63	80.6	14.5
Sephadex G-100 (II)	0.24	15.3	63.75	167.8	11.3

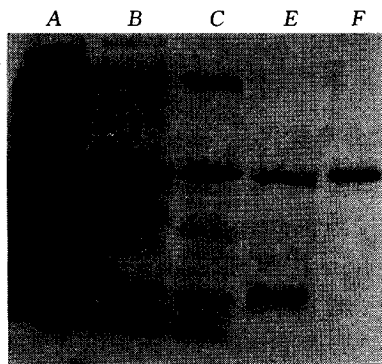


图 2 酶纯化各阶段的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

A: 粗酶液; B: 70%~100% (NH₄)₂SO₄ 部分; C: Q Sepharose FF; E: Hydroxyapatite; F: Sephadex G-100(II).

2.2 纯化酶部分生化性质

2.2.1 最适 pH 和 pH 稳定性: 该酶在 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液中大约 pH 6.2 有最高活性. 纯化酶在不同 pH 值的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液处理 5 min, 然后测定该酶保持的活性, 表 2 结果表明该酶在 pH 5~8 之间酶活相当稳定, 超过这一范围, 酶活力明显下降. 在 pH 4.0 和 pH 10.0 条件下, 酶大部分失活.

表 2 pH 对酶稳定性的影响

pH	酶活力
4.0	0.022
5.0	0.288
5.8	0.296
6.2	0.316
6.6	0.358
7.0	0.307
7.8	0.303
9.0	0.146
10.0	0.007

注: 酶活力以 0.1 ml 酶液每分钟反应产生的 ΔA_{340} 表示.

2.2.2 热稳定性: 将等量酶液置于 pH 7.0 的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液中, 在 25℃~50℃ 之间处理不同时间, 迅速冷却后测定酶活力, 结果表明该酶在 25℃~30℃ 稳定, 超过 30℃ 酶活力明显下降, 在 50℃ 下处理 30 min 仅保留 35%.

2.2.3 酶的动力学性质: 测定纯化酶对 3-DG 的米氏常数, 由图 3 可知表观米氏常数 K_m 为 2.3 mmol/L.

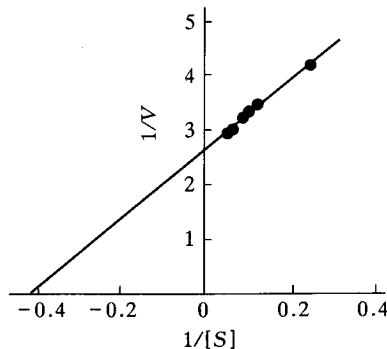


图 3 酶对 3-DG 米氏常数 K_m 的测定

2.2.4 底物的特异性: 表 3 列出了各种可能作为 2-羧基醛还原酶的羧基化合物. 2-羧基醛化合物例如 3-DG、甲基乙二醛是该酶很好的底物, 苯甲醛、戊二醛、二羟丙酮也能以一定的速度被酶催化还原. 该酶对葡萄糖、果糖、低级脂肪醛、酮以及酯类没有活性. 该酶特别需要 NADPH 辅酶参与反应, NADPH 被 NADH 取代后, 以 3-DG 为底物测定酶活, 结果酶活仅为原来的 3%.

2.2.5 —SH 基团和金属离子的影响: 纯化酶经 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 透析去除巯基乙醇, 在室温下将各种不同的物质适量加入酶液中保温 15 min 后测酶活. 以不添加任何试剂作为对照. 表 4 结果表明, 螯合剂 EDTA 不抑制酶的活性, 表明该酶的活性不需要金属离子的参与. 添加

EDTA 能明显地提高酶的活性. 这是由于 EDTA 螯合了一些存在于试剂中的能抑制酶的活性的痕量金属离子. 添加低于 10 mmol/L 巯基乙醇或 1 mmol/L 二硫苏糖醇能明显提高酶的活性. 当巯基乙醇浓度添加为 20 mmol/L 时, 酶活力下降, 表明巯基保护剂添加过量亦会对酶起毒害作用. 碘乙酸、N-乙基顺丁烯二酰亚胺抑制酶的活性.

表 3 纯化酶的底物特异性

底 物	相对活性/ %
3-脱氧葡萄糖醛酮	100
甲基乙二醛	77.2
苯甲醛	43.6
二羟丙酮	35.1
戊二醛	12.4
甲 醛	0
乙 醛	0
丙 酮	0
葡萄糖	0
果 糖	0
葡萄糖酸内酯	0
葡萄糖醛酸内酯	0

表 4 -SH 基团和金属离子对酶活性的影响

试 剂	相对活性/ %
空 白	100
巯基乙醇 (1 mmol/L)	122
巯基乙醇 (10 mmol/L)	99.0
巯基乙醇 (20 mmol/L)	85.3
二硫苏糖醇 (0.1 mmol/L)	116.3
二硫苏糖醇 (1.0 mmol/L)	110.2
EDTA (5 mmol/L)	112.2
EDTA (10 mmol/L)	117.0
碘乙酸 (10 mmol/L)	44.6
N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (0.1 mmol/L)	89.8

2.2.6 酶的分子质量

纯化酶分别采用电泳法和高效体积排除色谱法测定分子质量 (图 4). 色谱法测定为 28 ku, SDS-聚丙烯酰胺凝胶上显示单一的带, 分子质量大约为 32 ku. 这种酶是一种单体. 分子质量的差异也许来自实验方法的不同引起的实验误差或酶含有其他化学基团.

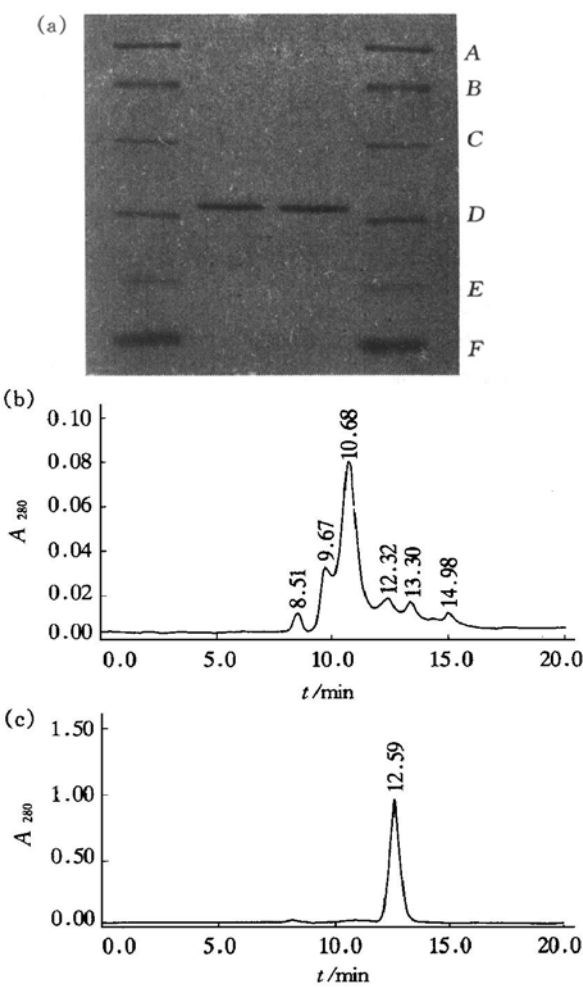


图 4 纯化酶分子质量的测定

(a) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, A: 兔磷酸化酶 B (97 400); B: 牛血清白蛋白 (66 200); C: 兔肌动蛋白 (43 000); D: 牛碳酸肝酶 (31 000); E: 胰蛋白酶抑制剂 (20 100); F: 鸡蛋清溶菌酶 (14 400); (b) 六种低分子质量标准蛋白的 HPLC 色谱图; (c) 纯化酶的 HPLC 色谱图.

3 讨 论

我们曾报道从细菌中筛选对 3-DG 有强氧化或还原活性的菌株, 发现细菌中普遍存在 3-DG 代谢酶^[4]. 被测菌株对 3-DG 的氧化酶活性较低而还原酶活性较高. 我们选择以 NADPH 为辅酶还原酶活性最高的 *Bacillus* sp.2 来分离纯化了 3-DG 代谢酶.

醛酮还原酶是在 NADPH 共同参与下催化大量的脂肪族和芳香族醛和酮还原的一族还原酶. 根据酶对底物的特异性和各自的米氏常数, 这一族酶可划分为不同的类别: 例如醛还原酶 (EC1.1.1.2)、醛糖还原酶 (EC1.1.1.21)、羰基还原酶

(EC1.1.1.184) 和 2-羰基醛还原酶^[8]. 从细菌 *Bacillus* sp. 2 中分离出来的酶对 2-羰基醛化合物有很高的活性, 对 3-DG 的活性最高, 而对低级脂肪醛或酮活性很低甚至没有. 该酶属 2-羰基醛还原酶.

猪肝脏、欧芹中 2-羰基醛还原酶与细菌 *Bacillus* sp. 2 中 2-羰基醛还原酶有以下几点不同:

a. 在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离中, 猪肝脏、欧芹酶主要集中在 45% ~ 70% 之间, 而本研究获得的纯化酶主要集中在 70% ~ 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀中; b. 三种酶在 Hydroxyapatite 柱上色谱行为是不同的. 猪肝脏酶从柱上流出而欧芹、细菌酶吸附在柱上, 欧芹酶在约 280 mmol/L 磷酸钾缓冲液下被洗脱, 细菌酶在约 380 mmol/L 浓度梯度下方可被洗脱; c. 猪肝脏酶是分子质量为 38 ku 的单体, 欧芹酶是分子质量为 67 ku 的二聚体, 细菌酶是分子质量为 32 ku 的单体. d. 猪肝脏酶对 3-DG 的 K_m 为 2.1 mmol/L, 欧芹酶为 15 mmol/L, 细菌酶为 2.3 mmol/L.

2-羰基醛化合物例如甲基乙二醛和 3-DG 是一种反应性很强能引起细胞死亡的化合物. 甲基乙二醛代谢酶系统通过控制细胞内甲基乙二醛的含量调节细胞的分化^[3]. 3-DG 是美拉德反应的主要中间产物之一, 能引起蛋白质的交联, 导致生物活性的丧失, 细胞和组织的老化. 长寿蛋白例如胶原和晶体蛋白的交联随老化和糖尿病而被加速. 2-羰基醛还原酶还原 3-DG 为 3-脱氧果糖, 该物质可在人的血浆中测出. 在老鼠尿中也发现了 3-脱氧果糖. 通过调节 3-DG 在体内的含量可控制老化和糖尿病的加剧^[9]. 2-羰基醛还原酶在这之中也许起着控制 3-DG 含量的作用.

动植物中 2-羰基醛还原酶已证实能抑制美拉德反应的高级阶段, 推测细菌中的这种还原酶也能抑制. 如果该推测被证实, 这将为今后该酶的工业化生产提供更大的可行性, 为进行体内大量的临床试验提供来源, 进而可能为老化、糖尿病、动脉硬化、白内障等的治疗提供科学依据和手段.

参 考 文 献

- 1 Liang Z Q, Hayase F, Kato H. Purification and characterization of NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase from porcine liver. A self-defence enzyme preventing the advanced stage of the Maillard reaction. *Eur J Biochem*, 1991, **197** (2): 373~ 379
- 2 Kato H, Liang Z Q, Nishimura T, *et al.* 3-Deoxyglucosone-enzyme in plants: NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase of

Parsley. *Agric Biol Chem*, 1988, **52** (10): 2675~ 2677

- 3 Liang Z Q, Hayase F, Nishimura T, *et al.* Purification and characterization of NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase from Parsley. *Agric Biol Chem*, 1990, **54** (2): 319~ 328
- 4 Liang Z Q, Su G J, Liang J J, *et al.* Studies on production conditions for NADPH-dependent 3-deoxyglucosone reductase from *Bacillus* sp. 2. *Microbiology*, 1998, **25** (6): 332~ 334
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurements. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1), 265~ 275
- 6 Weber K, Osborn M. Reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 1969, **244** (16): 4406~ 4412
- 7 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 8 Liang Z Q, Hayase F, Kato H. Aldose reductase from porcine liver metabolizing 3-deoxyglucosone, a Maillard reaction intermediate. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56** (7): 1074~ 1078
- 9 Yamada H, Miyata S, Igaki N, *et al.* Increase in 3-deoxyglucosone level in diabetic rat plasma. *J Biol Chem*, 1994, **269** (32): 20275~ 20285

Purification and Characterization of 3-Deoxyglucosone Metabolizing Enzyme From *Bacillus* sp. 2. LIANG Zhi-Qun, SU Gu-Jiao, LI Xiang-Ping, MO Bo-Li, LIANG Jing-Juan (*The Industrial Testing and Experimental Centre of Guangxi University, Nanning 530004, China*).

Abstract A NADPH-dependent 3-DG metabolizing enzyme was isolated and purified to electrophoretic homogeneity from *Bacillus* sp. 2 by combined consecutive treatment consisting of ammonium sulfate fractionation, Q Sepharose FF, Sephadex G-100 (I), Hydroxyapatite and Sephadex G-100 (II) column chromatographies. The specific activity of purified 3-DG metabolizing enzyme was 63.75 U/mg. The molecular weight of the enzyme was about 32 ku. 2-Oxoaldehyde compounds were found to be specifically good substrate for this reductase. The optimum pH of the enzyme activity was 6.2. The enzyme was stable in the pH range from 5 to 8 and in the temperature range from 25 °C to 30 °C. The K_m for 3-DG was 2.3 mmol/L. Suitable amount of EDTA, β -mercaptoethanol and dithiothreitol enhanced the enzyme activity, but the activity of the enzyme was partially lost by adding iodoacetic acid or N-ethylmaleimide.

Key words Maillard reaction, 3-deoxyglucosone, bacteria, reductase, purification, characterization