

## 参 考 文 献

- [1] Forsblom, S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3255, 1976.
- [2] Rigler, R. et al.: *In Gene Functions Proc. FEBS 12th Meeting Dresden* (ed. s. Rosenthal et al.), vol. **51**, 147, 1978.
- [3] Chatteraj, K. K. et al.: *Virology*, **81**, 460, 1977.
- [4] Langowski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4727, 1980.
- [5] Goppelt, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **104**, 101, 1980.
- [6] Halford, E. et al.: *Biochemical J.*, **191**, Paper 227 (80/381), 1980.
- [7] Halford, E. et al.: *ibid.*, **191**, Paper 228 (80/381) 1980.
- [8] Modrich, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866, 1976.
- [9] Langowski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3483, 1981.
- [10] Jack, W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 4010, 1982.

[本文于 1984 年 5 月 7 日收到]

# 不同修饰剂对尿激酶化学修饰的对比研究

曹淑桂 程玉华

(吉林大学分子生物学系, 长春)

近年来为了解除某些酶制剂的抗原性<sup>[1,2]</sup>, 提高某些酶对环境的稳定性和延长其在体内的半衰期<sup>[3-6]</sup>, 以充分发挥其临床效果, 国内外曾用 PEG<sup>[1,2]</sup>, Dextran 及其硫酸酯<sup>[3-5]</sup>, 肝素钠<sup>[6]</sup>等水溶性大分子对某些酶制剂的自由氨基进行共价修饰, 取得了较好效果。但是由于各个实验室所修饰的酶不同, 所用修饰剂及其活化方法也不同, 所以对这些修饰剂或活化方法的修饰效果难以进行比较。因此我们用不同修饰剂采取不同活化方法对同一种酶——尿激酶进行修饰, 观察比较不同修饰剂和活化方法对修饰酶活性和稳定性的影响。

本文报道了肝素钠, Dextran 和 PEG 对尿激酶自由氨基共价修饰的对比研究。结果表明, 修饰物产率达 90% 以上时, PEG 对酶活力损失较大, 而 Dextran 及肝素对酶活力的影响较小, 其中肝素修饰酶在活力保持和某些其它性质方面均较其它二种修饰酶为优。在肝素作修饰剂的活化方法中溴化氰法优于高碘酸氧化法。这为进一步提高酶分子修饰技术提供了必要数据。

## 一、材料与方 法

### (一) 材料

尿激酶 吉林大学生生化实验厂提供, 比活 5 万 U/mg 蛋白。

肝素钠 上海生化制药厂产品, 生化试剂

溴化氰 Merck-Schuchardt 产品

右旋糖酐 (Dextran) 延吉市制药厂产品

单甲氧基聚乙二醇 (PEG) Union CARBIDE COR 产品, 分子量 5000。

胃蛋白酶 上海食品公司制药厂产品, (1:3000)

人血浆 长春生物制品研究所提供。

三硝基苯磺酸 (TNBS): 浙江黄岩城关助剂厂产品, 生化特定试剂。

尿激酶活力测定试剂 北京生物制品药检所提供。

其它试剂均为分析纯或化学纯。

### (二) 方法:

#### 1. 修饰酶的制备

按溴化氰法<sup>[7]</sup>制备活化肝素 (H<sub>CN</sub>) 及其

修饰酶 (UK-H<sub>CN</sub>)；高碘酸钠法<sup>[8]</sup>制备活化肝素 (H<sub>10<sub>4</sub></sub>) 和活化 Dextran (D<sub>10<sub>4</sub></sub>) 及其修饰酶 (UK-H<sub>10<sub>4</sub></sub>) 和 (UK-D<sub>10<sub>4</sub></sub>)；均三嗪法<sup>[9]</sup>制备活化 PEG 及其修饰酶 (UK-PEG)。

各种修饰酶分别通过 Sephadex G-100 分离得到纯修饰酶(层析图谱略)。

2. 尿激酶活力测定 气泡上升法<sup>[10]</sup>

3. 自由氨基测定 按文献[11]。

4. 荧光光谱测定 用美国 Spex 1902 型荧光仪。

5. 抗蛋白酶水解能力 在 pH3.1 的 0.05M 的甘氨酸-盐酸缓冲液中,胃蛋白酶与尿激酶浓度比为 1:1, 各反应体系中酶蛋白浓度均为 0.16mg/ml 的条件下测定不同水解时间后天然酶和纯化修饰酶的残余活力。

6. 离体血浆对尿激酶的降解实验 分别取

1ml 0.02 mg 蛋白/ml 的各种尿激酶加入到 0.5ml 的 6.24% (W/W) 的冻干人血浆生理盐水溶液中, 测不同时间后天然酶和纯化修饰酶残余活力。

## 二、结 果

### 1. 修饰剂浓度对修饰尿激酶的活力影响

在 pH 9 的碱性介质中<sup>[2,3]</sup>修饰剂与尿激酶按照 5:1, 7:1, 9:1 的重量比和实验 2, 3 所确定的最适修饰时间共价修饰后, 测其修饰酶活力, 如表 1。

由表 1 可见随修饰剂浓度的增加, 各种修饰酶残余活力均有所减少。为了保持较好酶活力, 自由氨基尽可能多地被修饰以达到改进某些酶学性质的目的。我们认为 7:1 为最适修饰剂浓度。

表 1 各种修饰酶残余活力

修饰剂: 尿激酶 (mg) (mg 蛋白)	各种修饰酶残余活力%			
	UK-H <sub>CN</sub>	UK-H <sub>10<sub>4</sub></sub>	UK-D <sub>10<sub>4</sub></sub>	UK-PEG
5:1	100	100	100	63.1
7:1	94.8	90.7	93.5	60.3
9:1	94.1	89.5	65.8	51.0

修饰温度: 4°C

### 2. 修饰时间对尿激酶活力的影响

修饰剂与尿激酶按照 7:1 的重量比在 4°C pH 9 的条件下进行共价修饰, 测在不同时间后修饰酶的残余活力, 见表 2。

表 2 不同修饰时间对尿激酶活力的影响

残余活力 (%)	修饰时间 (h)							
		0.5	1	4	6	9	12	24
UK-H <sub>CN</sub>	—	100	100	97.8	94.9	94.8	88.1	
UK-H <sub>10<sub>4</sub></sub>	—	98.7	93.0	90.7	78.9	69.8	60.2	
UK-D <sub>10<sub>4</sub></sub>	—	99.0	93.8	93.1	80.2	75.3	65.8	
UK-PEG	65.3	55.0	—	—	—	—	—	

### 3. 不同修饰时间的自由氨基测定

尿激酶在上述实验条件下经不同时间修饰后其残余自由氨基如表 3。

表 3 尿激酶残余自由氨基

尿激酶	UK-H <sub>CN</sub>		UK-H <sub>10<sub>4</sub></sub>		UK-D <sub>10<sub>4</sub></sub>	
修饰时间(时)	5	12	5	12	5	12
残余自由氨基%	79	64	52	51	59	56

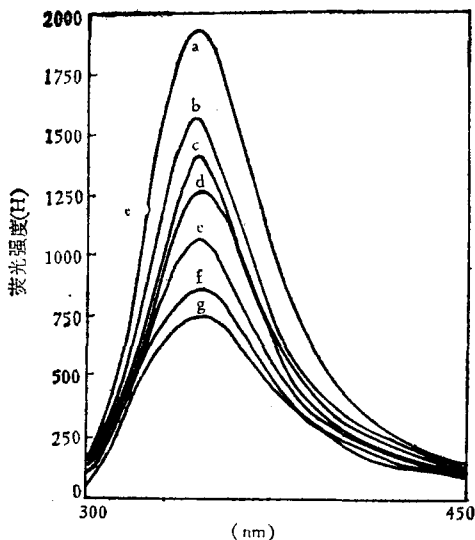
### 4. 荧光光谱测定

在激发波长为 280nm 下, 测得天然酶(uk)和加入修饰剂后不同修饰时间的荧光光谱。各种修饰剂加入后荧光强度随修饰时间的延长有所降低如图 1。

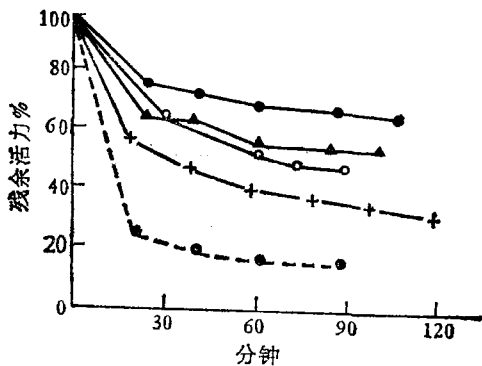
### 5. 修饰酶抗蛋白水解酶的能力

天然酶(uk)和修饰酶 (uk-PEG, uk-D<sub>10<sub>4</sub></sub>, uk-H<sub>10<sub>4</sub></sub> 和 uk-H<sub>CN</sub>) 经胃蛋白酶水解不同时间后, 各种修饰酶残余活力均明显高于天然酶, 其中以 uk-H<sub>CN</sub> 为最佳。如图 2。

### 6. 冻融实验



**图1 天然酶与修饰酶的荧光光谱**  
 a UK b、c、d UK-H<sub>CN</sub> 修饰时间分别为  
 0、6、12小时 e、f、g UK-H<sub>IO<sub>4</sub></sub> 修饰时间  
 分别为0、6、12小时  
 溶剂: pH3.6 0.2M 甘氨酸-盐酸缓冲液  
 样品浓度: UK: 0.11mg 蛋白/ml  
 UK-H<sub>CN</sub>: 0.11mg 蛋白  
 0.77mgH<sub>CN</sub>/ml;  
 UK-H<sub>IO<sub>4</sub></sub>: 0.11mg 蛋白  
 0.77mgH<sub>IO<sub>4</sub></sub>/ml



**图2 抗胃蛋白酶水解能力**  
 pH3.1 0.2M 甘氨酸-HCl 缓冲液; 室温  
 - - - - - UK-H<sub>CN</sub>    ▲-▲-▲ UK-H<sub>IO<sub>4</sub></sub>  
 ○-○-○ UK-D<sub>IO<sub>4</sub></sub>    ×-×-× UK-PEG  
 ●-●-● UK

各种尿激酶经过 -8℃ 冻结, 室温 (15℃) 融化后活力均有所损失, 但是修饰酶损失大为减少尤其是 uk-D<sub>IO<sub>4</sub></sub>, 其活力可保持 74%, 如表 4。

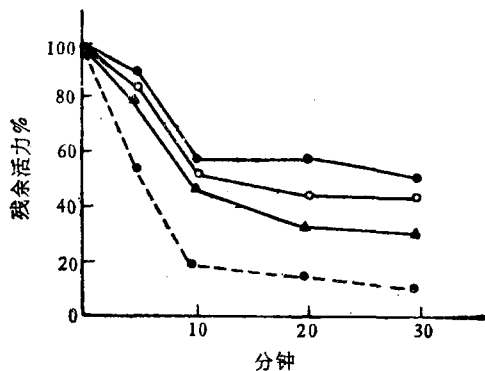
### 7. 离体血浆对尿激酶的降解实验

天然酶(uk)和修饰酶 (uk-D<sub>IO<sub>4</sub></sub>, uk-H<sub>IO<sub>4</sub></sub>,

**表4 冻融实验**

各种尿激酶	UK	UK-H <sub>CN</sub>	UK-H <sub>IO<sub>4</sub></sub>	UK-D <sub>IO<sub>4</sub></sub>
残余活力%	16	55	30	74

uk-H<sub>CN</sub>) 在离体血浆中的活力随时间的延长而减少, 而修饰酶残余活力均高于天然酶, 其中 uk-H<sub>CN</sub> 为最佳。图 3。



**图3 抗离体血浆降解的能力**

- - - - - UK-H<sub>CN</sub>    ○-○-○ UK-D<sub>IO<sub>4</sub></sub>  
 ▲-▲-▲ UK-H<sub>IO<sub>4</sub></sub>    ●-●-● UK

## 三、讨论

在本实验条件下, Dextran 修饰酶活力可保持天然酶的 93.5%, 活力保持较好, 这与 Reiner<sup>[12]</sup>报道是一致的。肝素是与 Dextran 类似的粘多糖, 所以其修饰酶活力也保持较好, 而且溴化氰法优于高碘酸钠法, 这可能是由于氧化引起多糖开环产生的醛基比溴化氰活化的基团活泼所致。PEG 修饰酶活力损失较大, 据报道<sup>[1]</sup>, 许多酶用 PEG 修饰后活力都有严重损失。尽管如此, PEG 目前仍是解除抗原性较好的修饰剂。修饰中活力的损失是逐渐增加的, 而且当氨基修饰 40% 时活力仅损失 10% 左右。因而表明氨基不参与尿激酶活性部位的组成。这种活力的损失可能是由于大分子修饰剂对酶一底物结合的空间障碍引起的。

修饰反应的时间效应因不同修饰剂和不同活化方法而异。均三嗪法修饰 1 小时后活力只剩 55%; 高碘酸钠法 4—6 小时可维持 90% 左右, 残余氨基为 50—60%; 溴化氰法 12 小时后

活力保持 94.8%，残余氨基为 64%。由此确定本文最适修饰时间，溴化氰法为 12 小时，均三嗪和高碘酸钠法分别为 1 和 4 小时，与文献<sup>[2,7,8]</sup>基本一致。可见用不同方法活化的修饰剂其偶联反应的能力是不同的。为了在较好地保持酶活力的前提下有更多的自由氨基被修饰，则需要根据不同活化方法选择不同的修饰时间。

荧光光谱及其残余的活力和氨基测定表明，残余自由氨基越少，即修饰程度越高，酶活力越低，荧光强度变得越弱，它们之间有着一定相关性。荧光强度的降低可能是由于修饰剂分子对酶分子中的荧光发射基团的屏蔽效应和修饰剂本身的羧基、羟基的淬灭作用<sup>[13]</sup>。

各种修饰酶均具有较强的抗酶解、抗冻融、抗稀释变性的能力，这可能是由于修饰剂分子的屏蔽作用。肝素和右旋糖酐的修饰酶又优于 PEG 修饰酶。这可能是由于多糖的羟基等极性基团的存在使其在水溶液中容易形成溶剂化层，这对酶分子会有一定的稳定和保护作用。

总之，溴化氰法偶联反应最为温和，可以在较好保持酶活力的前提下使酶学某些性质得到改进。但是不同修饰剂其分子结构不同，对于

酶分子改造也各有其特点。因此如何根据需要选择或改进现有的修饰剂和修饰路线值得进一步探索。

## 参 考 文 献

- [1] Sovoca, K. V. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 47, 1979.
- [2] 芦原義弘、西村裕之、稻田祐二: *化学の領域*, **33**(1), 44—45, 1979.
- [3] 伊賀善郎: *公開特許公報*, 昭 **54**, 113488.
- [4] 村上彰弓: *公開特許公報*, 昭 **55**, 26878.
- [5] 金凤燮: 《吉林大学研究生論文集刊》, (2), 114, 1982.
- [6] 曹淑桂, 程玉华: 《吉林大学自然科学學報》, (1), 122, 1984.
- [7] Axen, R., et al.: *J. Biochem.*, **18**, 357, 1971.
- [8] Flemming, Ch., et al.: *Acta. Biol. Med. Ger.*, **30**, 177—182, 1973.
- [9] Abraham, Abuchowrki, et al.: *J. B. C.*, **252**, 11, 3578—81, 1977.
- [10] 《吉林大学上海医学院尿激酶鉴定会材料》, 1978.
- [11] Habeeb, A. F. S. A.: *Analytical Biochemistry*, **14**, 328—36, 1966.
- [12] Reiner, R. R. et al.: *Enzyme Engineering*, Vol. **4**, 111, 1978.
- [13] 鲁子贤: 《蛋白质化学》, 102 页, 科学出版社, 北京, 1981.

[本文于 1984 年 3 月 19 日收到]

## 胰岛素-牛血清蛋白对蟾蜍跨皮静息电位的效应

李宏钧 周汉清

(复旦大学生物系, 上海)

近年来一些工作者研究了肽激素对细胞和组织电过程的影响, 包括胰岛素对可兴奋细胞和上皮组织静息电位的效应。例如 Zierler<sup>[1]</sup>发现胰岛素能提高鼠骨骼肌的静息膜电位。Lantz<sup>[2]</sup>等人发现胰岛素对心肌亦有类似作用。deMello<sup>[3]</sup>和 Moore<sup>[4]</sup>观察到胰岛素引起蛙缝匠肌细胞的超极化, 而 Rehm<sup>[5]</sup>等人则检测了蛙的胃粘膜对胰岛素作用的电反应。本文作者以蟾蜍离体皮肤为对象, 试图查明胰岛素对上皮细胞的作用, 以进一步探究细胞静息电位的变化和膜透性之间的关系。

## 材 料 和 方 法

以上海郊区中华蟾蜍为实验材料。标本制备、实验装置和测试条件基本与前一工作<sup>[6]</sup>相同。

胰岛素结晶(上海生化制药厂)经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为单点, 证明质纯。出厂效价 28.18 单位/毫克。用 0.1% 牛血清蛋白配成 4 单位/毫升的贮藏液放冰箱中保存, 实验时再按需要稀释成各种浓度备用。牛血清蛋白(上海牛奶公司综合厂产品)电泳单点质纯。