

月桂酸修饰超氧化物歧化酶的制备及其性质研究

阎家麒 谢文正*

(郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450045)

摘要 用月桂酸对超氧化物歧化酶进行化学修饰以改善其稳定性. 活化的月桂酸与 SOD 在 40℃ 碱性条件下反应 1h, 再用 Sephacryl S-200 柱进一步纯化. 修饰 SOD 活性回收率 93%, 比活为 6000U/mg. 具有较强的稳定性, 基本上消除了免疫原性并明显地延长了在血液中的半衰期. 该产品适用于化妆品和食品.

关键词 超氧化物歧化酶, 化学修饰, 酶工程, 化妆品

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 是一种能专一地清除超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的金属酶, 具有抗衰老、抗辐射、抗炎和抗癌等作用. 但由于 SOD 在体内半衰期较短, 只有 5—10min^[1], 稳定性较差, 容易失活, 尤其 SOD 具有异源蛋白的免疫原性. 因而, 无论作为药用酶还是作为化妆品或食品的添加成分, 实际应用效果并不理想. 为此, 近年来国内外应用酶工程方法, 用右旋糖酐 (dextran)^[2-4], 聚乙二醇 (PEG)^[5], 聚蔗糖 (Ficoll)^[6] 及药用淀粉^[7] 等对 SOD 进行化学修饰, 均取得了比 SOD 某些性质优越的修饰酶. 但是上述修饰 SOD 分子量过大 (>100 000), 细胞膜无法通透, 静脉注射易发生毛细血管栓塞, 只有实验室意义, 药用价值不大. 又由于其修饰工艺成本过高, 产品价格昂贵, 限制了在化妆品或食品中的应用.

本文以 12 碳原子数的月桂酸为修饰剂, 对 SOD 的酶分子表面赖氨酸进行共价修饰, 获得了半衰期长, 稳定性强, 无免疫原性, 高比活, 低分子量的月桂酸修饰超氧化物歧化酶 (lauric acid-SOD, 简称 LA-SOD). 该修饰工艺简单, 生产成本低廉, 现已工业规模生产并在化妆品中应用, 现报道如下.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

牛血 (Cu, Zn-SOD, 依据文献^[8]方法制备; 月桂酸, Aldrich 公司产品; 氯化亚砷, 重庆化工厂产品; 吡啶 DMF, 北京化工厂产品; Sephadex G-100, Pharmacia 产品; Sephacryl S-200, Pharmacia 产品, 其他试剂均为分析纯. UV-160 岛津紫外可见分光光度计; YT-110-Cu 中空纤维透析器, 亚太公司宁波医疗器械厂产品.

1.2 方法

1.2.1 月桂酸活化 月桂酸与氯化亚砷在 90—95℃ 下搅拌反应 2h, 回流 2h, 加入少量催化剂吡啶 DMF. 将反应物进行分馏、减压, 并除去过量的氯化亚砷, 再收集 146—150℃ 馏分, 即得到活化的月桂酸. 透析、冻干为白色粉末, 置冰箱保存备用.

1.2.2 LA-SOD 制备 取 Cu, Zn-SOD (4500U/mg) 溶于弱碱性磷酸 (PBS) 缓冲液, 20℃ 下搅拌溶解. 搅拌下加入活化的月桂酸, 随即温度升至 40℃, 搅拌 60min 迅速降至室

*新乡市高科生物化学工程有限公司, 新乡 453000.

收稿日期: 1993-03-01, 修回日期: 1993-04-21

温, 加入 3 倍量预冷 (-18°C) 丙酮, 离心 (4000r/min) 收集沉淀, 沉淀溶解于适量双蒸馏水, 离心 (4000r/min) 除去不溶物. 上清液通过中空纤维透析器, 对蒸馏水透析, 透析液上预先用 2.5mmol/L, pH7.6 磷酸钾缓冲液平衡好的 Sephacryl S-200 层析柱 (5cm \times 73cm), 收集酶活性部分. 透析, 超滤, 冻干, 即得 LA-SOD.

1.3 分析测定

1.3.1 活性测定 采用经典邻苯三酚自氧化法^[9], 以标准品 SOD 校正. 蛋白质浓度测定依据 Lowry 氏法^[10].

1.3.2 残余氨基测定 采用 TNBS 滴定法^[11].

1.3.3 体内半衰期测定 依据文献^[12]方法, 选用雄性豚鼠 (体重 250—280g) 8 只, 分为 LA-SOD 试验组和 SOD 对照组, 每组 4 只. 试验组每只经颈静脉注射生理盐水溶解的 LA-SOD 0.6mg; 对照组每只注射 SOD 0.6mg. 注射后每隔 5min, 15min, 60min, 2h, 5h, 10h, 20h 各采血 0.4ml, 测定血清中酶活性.

1.3.4 分子量测定 用 Sephadex G-100 凝胶过滤法, 以血红蛋白 (M_r 为 15 500), 胰蛋白酶 (M_r 为 24 500), 卵白蛋白 (M_r 为 43 000) 和牛血清白蛋白 (M_r 为 68 000) 作为指示蛋白.

1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度分析^[13] 凝胶浓度 10%, 电极缓冲液为含 0.1% SDS, 0.1mol/L, pH7.2 磷酸盐缓冲液. 考马斯亮蓝 R250 染色.

1.3.6 免疫原性测定 用被动皮肤过敏反应 (PCA) 法^[14]. 动物致敏: 取 LA-SOD 和 SOD 各 20 μg , 用弗氏完全佐剂乳化, 分别取 0.2ml 乳化液注入小鼠腹腔内, 第 14 天和第 28 天重复一次. 其间每隔 7d (天) 经眶静脉采血, 用 PCA 法鉴定血清中抗体. 分别取 0.1ml 稀释的血清于大鼠真皮内注射, 然后再注射含有 0.5mg LA-SOD 或 SOD 和 20mg 伊文思蓝的溶液, 4h 后, 由皮肤过敏反应形成的圆环状蓝斑进行测定.

1.3.7 热及水溶液状态下的稳定性试验 将 LA-SOD 样品分别在 40 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 下保温, 定时取样测活性, 用分数有效期法^[15]推算出在 20 $^{\circ}\text{C}$ 保温条件下 LA-SOD 液体保存的有效期, 以活性保存 90% 计算. 用 SOD 样品作对照.

1.3.8 抗蛋白水解酶能力 将同一浓度的 LA-SOD 和 SOD 分别加入 10% 胃蛋白酶溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温, 在 1h, 2h, 3h 分别取样测其活性.

1.3.9 急性毒性实验 依据中华人民共和国药典 (1990 年版) 方法.

1.3.10 皮肤刺激试验 方法同上.

2 结果与讨论

2.1 产品 LA-SOD 比活 6000U/mg, 活性回收率为 93%. 表明酶活性部位经修饰后仍得到较好的保持.

2.2 LA-SOD 残余氨基 20%, 氨基修饰率为 80%.

2.3 在血液循环中 SOD 的半衰期为 5min, 与文献值相符^[1], LA-SOD 半衰期为 15h. 表明半衰期不仅与修饰剂的分子量有关, 连接到酶上的修饰剂分子数量也起重要作用. 以分子量大的修饰剂修饰的酶不一定具有较长的半衰期, 用短链修饰剂修饰的 SOD 也可能具有较长的半衰期.

2.4 LA-SOD 分子量为 34 000—36 000, SOD 分子量为 32 000. 修饰 SOD 的分子量与修饰剂分子量及氨基修饰率呈正相关, 在修饰率相同的前提下, 要降低修饰 SOD 的分子量, 必须采用低分子量的修饰剂.

2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳对 LA-SOD 纯度分析显示一条斑带, 表明样品已达电泳纯.

2.6 免疫原性测定结果如表 1.

由表 1 可见, LA-SOD 无抗体产生, 而未修饰的 SOD 则产生抗体, 证明牛猪血来源的 SOD 具有免疫原性. 目前认为蛋白质表面的抗原决定簇大多由亲水性氨基酸, 特别是亲水性较强的赖氨酸组成^[5]. 用免疫惰性物质对酶

分子表面赖氨酸共价修饰, SOD 的表面抗原决定簇部分或全部被掩盖, 因而可使酶的免疫原性降低以致消除.

表 1 免疫原性试验

动物数	PCA 效价判定 ¹⁾					
	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	
SOD	10	6	30	240	240	240
LA-SOD	10	0	0	0	0	0

¹⁾表中 PCA 效价数值表示显示出 PCA 阳性反应的血清稀释的最大倍数.

2.7 LA-SOD 的稳定性较 SOD 显著增强, LA-SOD 对热稳定性测试结果如表 2.

表 2 LA-SOD 对热稳定性测定结果

活性/U	时间/h	温度/°C						
		0	1	3	5	11	27	72
70		2250	1588	909				
60		2250	1815	1031				
50		2250		2125	2096	1969	1800	871
40		2250		2375	2235	2230	2212	2032

分别以 70—60°C, 60—40°C, 60—50°C, 50—40°C 进行计算, 有效期分别为 2.2 年, 2.4 年, 1.5 年, 3.0 年, 平均为 2.3 年. 故 LA-SOD 在水溶液状态下, 20°C 可保存 2—3 年. 对照组未修饰 SOD 在同样条件下可保存 3—5 个月.

SOD 的化学修饰是通过 SOD 与修饰剂分子中存在的多个活性反应基团形成多点交联, 使酶的天然构象产生“刚性”, 不易伸展打开, 同时减少酶分子内部基团的热振动, 从而增强了酶的稳定性.

2.8 在蛋白水解酶作用下, 1h, 2h, 3h 酶活性存留: LA-SOD 分别为 63%, 42%, 25%; SOD 分别为 32%, 13%, 1%.

蛋白水解酶作用于酶分子某些特定敏感键

后, 导致蛋白质多肽键断裂, 交联于 SOD 上的月桂酸能产生空间障碍, 阻挡蛋白水解酶接近 SOD, 能“遮盖”SOD 分子敏感键免遭破坏. 此外, SOD 分子上许多敏感基团, 如赖氨酸的 ε-氨基等参与修饰反应, 交联上月桂酸后, 减少了酶分子遭受蛋白水解酶破坏的可能性.

2.9 急性毒性实验表明, 应用成年大鼠, 经口灌胃给药, 各组动物皆未出现死亡和中毒反应, 因而推论其最大无作用剂量及其半数致死量(LD₅₀)大于 10 000U 每公斤体重. 依据化合物急性分级标准, 该酶制剂属于无毒.

2.10 皮肤刺激试验未出现任何刺激性变化, 试验区与对照区无差别.

2.11 SOD 的化学修饰主要通过两种途径, 一是对 SOD 活性部位(组氨酸、精氨酸和半胱氨酸)的修饰, 属于酶分子内部修饰. 由于该法失活较多, 修饰剂难得, 成本过高而很少采用. 另一种是对 SOD 非活性部位赖氨酸的修饰, 赖氨酸远离活性中心, 属于酶分子表面的修饰. 该法活性回收率较高, 多被采用. 但目前国内外多用氰尿酸氯、溴化氰等活化剂活化右旋糖酐、聚乙二醇等大分子多糖, 由于活化剂本身具有毒性, 修饰物的降解产物在体内可能产生不良作用. 因此, 应在制备工艺中避免使用剧毒试剂, 以确保修饰酶药用、食用和化妆品用的安全性.

2.12 本工艺具有步骤简单, 反应时间短, 所需试剂易得, 生产成本低廉, 产品比活高, 活性回收率高, 反应条件温和且易于控制, 产品质量均一等优点, 适于工业规模生产. 产品具有较强的稳定性, 无免疫原性, 是新一代抗衰老生化制品, 具有广泛的应用前景.

致谢 本工作中, 稳定性由中国康复研究中心基础所钟峻测定; 半衰期、毒性刺激性由山西医学院高应教授测定; 氨基酸修饰率、电泳由山西大学生物系袁静明教授、河南省分析测试中心朱琰、常林开测定, 特此致谢.

参 考 文 献

1 McCord J M, Fridovich I. Superoxide and superoxide dis-

- mutase. New York: Academic, 1977; 129
- 2 Miyata K, Nakagawa Y. *Agric Biol Chem*, 1988; **52**: 1575
 - 3 张元亮. 生化药物杂志, 1987; (1): 17
 - 4 吴云, 袁勤生, 顾璆. 生物化学与生物物理学报, 1986; **18**: 308
 - 5 区耀华, 吕冬, 周昕. 生物化学与生物物理进展, 1989; **16**: 203
 - 6 Miyata K, Kawanishi H, Takarazuka H *et al.* *Eur Pat Appl*, 0070656, 1983: 1—20
 - 7 袁勤生, 谢卫华, 姚菊芳等. 中国医药工业杂志, 1989; **20**: 351
 - 8 阎家麒, 朱建梅, 桂兴芬等. 中国医药工业杂志, 1992; **23**: 481
 - 9 Marklund S, Marklund G. *Eur J Biochem*, 1974; **47**: 469
 - 10 Lowry O H, Rosebrough N J, Faff A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
 - 11 Habeeb A F S A. *Anal Biochem*, 1966; **14**: 328
 - 12 上野均, 本行千里, 岡成栄治. ヘパリーニ修飾スーパーオキシドジスムターゼ C 12 N 9/02 // A61 K 37/50, 日本公開特許公報 231077, 1990: 1—4
 - 13 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 112—118
 - 14 Naohiro W, Zoltan O. *J Immun Meth*, 1977; **14**: 381
 - 15 Amlrjehed A K. *J Pharm Sci*, 1977; **66**: 785

科技消息

1993 年诺贝尔物理学奖简介

1993 年度诺贝尔物理学奖授予了美国 Princeton 大学的 R. A. Hulse 和 J. H. Taylor. 他们在 1974 年底发现了一颗射电脉冲星 PSR1913+16 (PSR 是脉冲星 pulser 的标记, 数字代表该星的坐标赤径和赤纬), 并证明它与另一颗中子星组成一个双星系统. 瑞典皇家科学院在颁奖辞中称该双星是“一个新的旋转太空实验室”, 为“有关引力的研究提供了新的机会”.

脉冲星是一种磁轴与自转轴不重合的高速自转的中子星, 而中子星是恒星演化到最后阶段的产物. 如果中子星的磁轴和转轴不重合, 同时地球相对于中子星的位置合适, 那么随着中子星的自转, 射电辐射束就会扫过地球形成等时间间隔的脉冲.

1974 年底, Taylor 和 Hulse 利用 Arecibo 射电天文台的 305 米的射电望远镜进行系统性搜寻时, 发现了脉冲星 PSR1913+16. 它的脉冲周期为 59ms, 即每秒种有 17 次脉冲辐射; 从观测资料可得出一条很好的视向速度曲线, 由此可推断该脉冲星处于一个双星系统, 即与另一颗星 (伴星) 因彼此引力作用而沿着轨道互相环绕运动, 同时因为未发现交食现象, 可推断其伴星也是一颗质量与脉冲星差不多的致密星 (最后证明也是一颗中子星).

Einstein 的广义相对论预言了引力波的存在, 即加速运动的物体会发射出引力波. 引力波的主要特性是: 在真空中以光速传播; 最低次为四级辐射; 辐射强度极弱等.

因为引力辐射极弱, 直接探测很困难. 1959 年, J. Weber 曾提出质量四极矩的 Weber 天线来接收宇宙中的引力波, 并在 1969 年声称探测到了来自银河系中心的引力波. 1987 年大麦哲伦星云 (属于银河系的近邻星系) 中的超新星 1987A 爆发时, 罗马一家天文台接收到了引力波. 然而这两个结果都因没有旁证而无法得到公认.

利用双星系统, 则是一种间接探测引力波的方法. 因为双星是一种典型的引力波辐射源, 不断的引力辐射, 会使能量逐渐减小, 导致双星的间距变小, 公转周期变短, 这种效应被称为引力辐射阻尼. 考虑到一些非相对论因素 (如两星体之间的潮汐作用、电磁辐射或星风等) 对公转周期的影响, 脉冲星 PSR1913+16 是目前已知的双星中唯一一个宜于进行引力理论检验的良好体系.

从 1974 年到 1992 年, Taylor 等人坚持了 18 年之久的对 PSR1913+16 的观测, 最后证实该脉冲星的公转周期的变化率为 $(-2.4101 \pm 0.0085) \times 10^{-12}$, 而利用广义相对论得到的理论结果为 $(-2.4025 \pm 0.0001) \times 10^{-12}$, 两者的吻合是相当好的. 这是引力波存在的第一个间接定量证据. 因为这一杰出的贡献, Taylor 和 Hulse 荣获了今年的诺贝尔物理学奖.

(CA)

Study on the Mechanism of Protective Effect of Zinc to Cells. Zhang Jingxia, Huang Ping, Xu Shiwen, An Lizhi, Yao Huiying, Xiao Yanan, Pan Juxiang, Chao Zhiyu, Zhu Jieqing, Wu Xiankang. (*Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (2): 147

On analyzing the distribution and composition of element in single cell with scanning proton microprobe (SPM) and synchrotron radiation X-Ray fluorescence microprobe (SR-XMF) it shows that zinc is a constituent of cell plasma. The levels of cellular zinc and iron were detected by above nuclear technique and the contents of MDA, SH group were estimated respectively by biochemical method for both normal and injured cell induced an peroxidation damage by hydroxyl-free radical. It was found that MDA content increased, SH group decreased, as well as Fe/Zn ratio raised during lipoperoxidation. By supplementation of zinc to culture medium, the inhibitory effect of zinc on lipoperoxidation was obvious from following experiment results that MDA content decreased, SH group content increased as well as Fe/Zn ratio reduced. The results suggest that zinc plays a role in maintaining the integrity of the cell and protects SH group of membrane protein thus preventing catalytic peroxidation reaction of iron.

Key words scanning proton microprobe (SPM), synchrotron radiation X-ray fluorescence microprobe (SR-XME), lipoperoxidation, zinc, protect

Studies on the Photoelectric and Kinetic Spectroscopic Properties of Acetylation Bacteriorhodopsin. Hu Kunsheng, Shi Hua, Huang

Ying, Yu Bi. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (2): 150
The role of lysine residues in the structure and function of bacteriorhodopsin (bR) was studied by the chemical modification method—acetylation. After acetylation, the photoreponse signals and the decay of photocycle intermediate M412 were slowed down while the yields of M412 were decreased. But UV/VIS absorption spectra did not show that the conformation around retinal chromophore was disturbed by acetylation. The effect of acetylation was weakened by high pH or salt media. The results imply that lysine residues do not directly participate in the proton translocation, instead, they affect this process by their contribution to the surface potentials.

Key words bacteriorhodopsin, photoreponse, acetylation, lipid bilayer

Studies on Preparation and Properties of Lauric Acid-Modified Superoxide Dismutase. Yan Jiaqi, Xie Wenzheng. (*Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450045*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 154

Superoxide dismutase is modified with lauric acid to improve its stability. Activated lauric acid was reacted with bovine Cu, Zn-superoxide dismutase at 40°C for 1h and it was further purified by a Sephacryl S-200 column. There are 93% recovery of enzyme activity from the resulting lauric acid-superoxide dismutase conjugate. The specific activity of this enzyme product was 6000U/mg. The modified enzyme showed enhanced stability, substantially free from immunogenicity and prolonged its half-life in blood. As a consequence, it can beneficially be used as an enzyme for cosmetics and

food industry.

Key words superoxide dismutase, chemical modification, enzyme engineering, cosmetics

Phase-Resolved Photoacoustic Spectroscopy and Photoacoustic Phase Spectrum of the Intact Leaf. Du Hao, Fang Jianwen, Zheng Jinju. (*Dept. of Phys., Zhejiang Normal University, Jinhua 321004*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 158

The phase-resolved photoacoustic spectroscopy has been used to analyse the pigmental distribution in intact plant leaves and has been compared with the photoacoustic phase spectrum of the leaves. The inverse correlation between the photoacoustic phase spectrum and absorption bands of chloroplasts has been observed. The characteristic valley exists in the photoacoustic phase spectrum of the leaf cuticle. In addition, there are some differences in the photoacoustic phase spectra obtained at different modulation frequency. The phenomena show that photoacoustic phase spectra can also be used for the nondestructive depth-profile analyses of biological sample as good as photoacoustic spectroscopy.

Key words phase-resolved photoacoustic spectroscopy, photoacoustic phase spectrum, phase-resolved method, intact plant leaf, depth-profile analysis

A New HPLC Separation for PTC Derivatives of Amino Acids by Ethanol Elution. Zhu Shudong, Zhao Huiren, Zhao Shenghao. (*Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 162

Analysis of phenylthiocarbonyl (PTC) amino acids with ethanol as organic eluent is described. Compared with acetonitrile elution

system, ethanol is less toxic, easier to obtain and much cheaper. Under optimized chromatographic conditions, the resolution, sensitivity and accuracy are excellent.

Key words ethanol, PTC amino acid, HPLC

Simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Zhang Hongquan, Wang Huixin, Zhou Tingchong, Wang Yunling. (*Inst. Bas. Med. Sci, Acad. Mil. Med. Sci. Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 165

A protocol by using 4 mol/L LiCl phasing the DNA and RNA could lead to simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Comparing with other methods, this protocol shows rapid, easy and economic, and can be used in many aspects especially in the studies of mammalian cell gene expression and regulation.

Key words total cytoplasmic RNA, genomic DNA, gene expression and regulation

The Method of PCR Direct Sequencing and It's Application in Cancer Research. Li Huachuan, Lu Shixin. (*Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 167

PCR direct sequencing is a method which combined PCR amplification with nucleic acid sequencing technique. According to this technique, direct sequencing DNA strand of PCR amplification using PCR primer, α -³⁵S dATP and Taq DNA polymerase. The experiment showed that it is simple, rapid and stable. This method was used to analyze the tumor