

ation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China).

Abstract Study and application of europium (Eu) labeled mouse monoclonal antibody (McAb) C₁₇ against carcinoembryonic antigen (CEA) by using a synthesized chelate-N¹- (μ -isothiocyanatobenzyl) -diethylenetriamine-N¹, N², N³, N³-tetraacetic acid Eu is described. The Eu-labeled C₁₇ was separated from excess reagent by gel filtration on a column of Sephadex G-50. The fluorescence and ultra-violet absorption for the fractions were monitored and the curves of fluorescence and the

optical density were all the same. The specific activity for the two tubes of the labeled-C₁₇ at the protein peak was 5.2 and 9.8 Eu³⁺/C₁₇ molecule respectively and the recovery of the labeled-C₁₇ was 64%. The labeled-C₁₇ was stable for 6 months at least. The standard curves of time-resolved immunofluorometric assay using the labeled-C₁₇ showed excellent linearity and slope and had been used in the assay of CEA in serum.

Key words time-resolved fluoroimmunoassay, time-resolved immunofluorometric assay, nonisotopic immunoassay, europium label

活性氧所致超氧化物歧化酶疏水性的变化*

李培峰 方允中

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 用抗坏血酸-Fe (Ⅲ) 和过氧化氢分别作用于铜锌超氧化物歧化酶 (SOD), 经疏水层析分离得到亲水型和疏水型 SOD. 用胰蛋白酶和胃蛋白酶分别作用于天然 SOD, 亲水型 SOD 及疏水型 SOD, 结果表明疏水型 SOD 较亲水型 SOD 及天然 SOD 易被降解, 提示活性氧氧化修饰后的 SOD 对蛋白水解酶敏感性提高与其疏水性增高有关.

关键词 铜锌超氧化物歧化酶, 活性氧, 疏水层析

生物体的许多代谢过程中伴随有 O₂⁻, •OH, H₂O₂, ¹O₂ 等活性氧产生, 铜锌超氧化物歧化酶 (SOD) 是清除 O₂⁻ 的重要酶, 但研究发现该酶可被其它类型活性氧 (如 H₂O₂, •OH 等) 氧化失活^[1,2], 失活 SOD 的理化性质及结构也发生变化^[3-5]. Reiss 等^[6]观察到细胞中有低活性或无活性 SOD 存在, 这很可能与活性氧氧化损伤有关.

天然 SOD 不易被胰蛋白酶和细胞中内源性蛋白酶所降解, 但活性氧氧化后 SOD 对蛋白酶水解的敏感性显著提高^[7]. 目前, 有关氧化损伤后 SOD 为何易被蛋白酶降解的机理尚未阐明. 本研究将抗坏血酸-Fe (Ⅲ) 和过氧化氢氧

化后 SOD 进行疏水层析得到疏水型和亲水型 SOD, 结果发现疏水型 SOD 易被蛋白酶降解, 提示 SOD 易被蛋白酶降解与其疏水性增强有关.

1 材料和方法

1.1 材料

牛 SOD 购自甘肃夏河生物制剂厂, 用前经 Sephadex G-100 再纯化, 每毫克蛋白中酶的比活为 3300 McCord-Fridovich 单位, 达电泳纯. 胰蛋白酶和胃蛋白酶为 Sigma 公司产品.

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-12-20, 修回日期: 1994-03-30

苯基琼脂糖购自 Pharmacia 公司, 其它试剂均为分析纯.

1.2 SOD 的处理

将 SOD 溶于 50mmol/L, Tris 缓冲液, pH7.8, 浓度为 0.4g/L, 然后加入一定浓度 H_2O_2 或抗坏血酸和 $FeCl_3$, 20℃, 作用 5h. 双蒸水透析后冰冻干燥备用. 用作对照的 SOD 经上述相同步骤处理, 但不加入 H_2O_2 或抗坏血酸和 $FeCl_3$.

1.3 疏水层析

将苯基琼脂糖装入层析柱中 (1.8cm × 25cm), 填料高度为 20cm. 用 100mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.0 (A 液) 平衡 12h, 再用含 1.0mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 A 液 (B 液) 平衡 12h. 上样后先用 B 液洗脱 10min, 然后用 A 液和 B 液进行梯度洗脱, $(NH_4)_2SO_4$ 浓度由高到低, 至 150min 时, 梯度结束, 然后用 A 液洗脱. 流速为 1ml/min.

1.4 酶解

用胰蛋白酶水解时, 将 SOD 溶于 50mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.8, 浓度为 1g/L, 加入胰蛋白酶使之与 SOD 比例为 1/50 (W/W). 用胃蛋白酶水解时, 将 SOD 溶于 50mmol/L 乙酸缓冲液, pH3.6, 浓度为 1g/L, 加入胃蛋白酶使之与 SOD 比例为 1/50 (W/W). 37℃, 作用 8h.

1.5 酶解测定

采用荧光胺法^[8], 主要步骤: a. 向酶解液中加入三氯醋酸使之浓度为 10%, 4℃静置 20min, 以 3000 × g 离心 10min, 取上清用 2mol/L NaOH 调 pH 至 8.0. b. 取 20μl 上清液加到 2.48ml 磷酸缓冲液, 50mmol/L, pH8.0, 边振荡边加入 0.5ml 荧光胺 (0.4mg/ml, 溶于丙酮中). c. 于日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定荧光强度, 激发波长 390nm, 发射波长 475nm.

1.6 SOD 比活性测定

采用化学发光法^[9], 发光仪为 LKB-1250 型.

2 结果与讨论

2.1 疏水层析

疏水层析原理是疏水载体和样品疏水基团之间相互作用而结合, 作用强度受中性盐的影响, 在水相中提高中性盐浓度可增强疏水载体和样品疏水基团之间相互作用, 相反就会减弱二者之间相互作用. 通过控制中性盐浓度调节疏水作用强弱, 以此达到分离目的. SOD 分子中有疏水区域, 它们主要由苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等非极性氨基酸的侧链密集在一起形成的. 天然 SOD 分子表面疏水性较弱, 因此在高浓度 $(NH_4)_2SO_4$ 溶液中, SOD 与疏水载体之间相互作用较弱, 至 75min 时就洗脱出来 (图 1 和图 2). 经抗坏血酸-Fe (Ⅲ) 和 H_2O_2 处理后的 SOD, 至 60min 时就有部分 SOD 被洗脱出来, 这部分 SOD 洗脱出来时间早于天然 SOD, 说明其疏水性较弱, 亲水性强, 称之为“亲水型 SOD”. 洗脱至 280min 时, 又有部分 SOD 洗脱下来, 这部分 SOD 表面富含疏水基团, 在高盐缓冲液中与疏水载体相互作用强, 当降低 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度后, 与疏水载体作用减弱, 因此, 将这部分 SOD 称之为“疏水型 SOD”. 另外, 将经 50mmol/L 抗坏血酸和

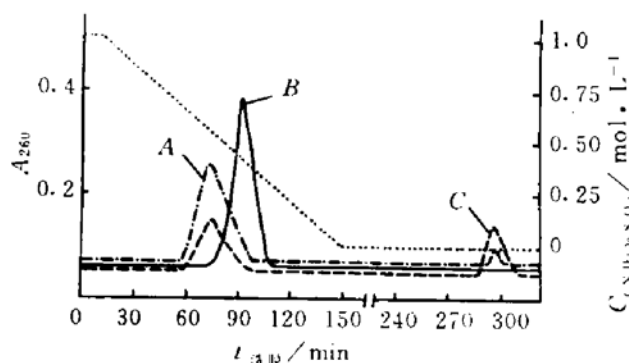


图 1 天然 SOD 及抗坏血酸-Fe (Ⅲ) 氧化 SOD 的疏水层析

—: 天然 SOD, — · — · —: SOD 经 25mmol/L 抗坏血酸和 0.2mmol/L $FeCl_3$ 处理, ----: SOD 经 50mmol/L 抗坏血酸和 1.0mmol/L $FeCl_3$ 处理,: $(NH_4)_2SO_4$ 洗脱曲线. A: 亲水型 SOD, B: 天然 SOD, C: 疏水型 SOD.

1.0mmol/L FeCl₃ 处理后的 SOD 与 25mmol/L 抗坏血酸和 0.2mmol/L FeCl₃ 处理后的 SOD 相比,其亲水型 SOD 相对较少,疏水型 SOD 相对较多(图 1)。同样,5mmol/L H₂O₂ 处理后的 SOD 与 1mmol/L H₂O₂ 处理后的 SOD 相比,亲水型 SOD 相对较少,疏水型 SOD 相对较多(图 2)。说明活性氧浓度越高,疏水形式 SOD 就越多。

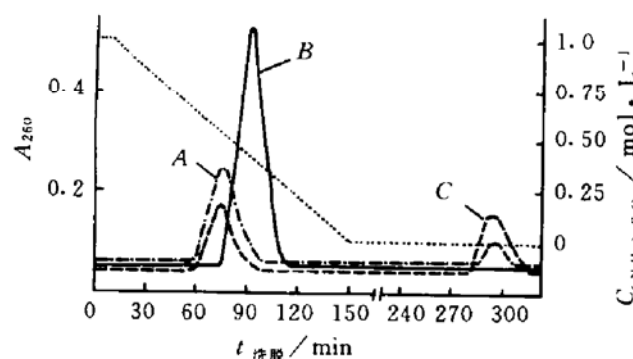


图 2 天然 SOD 及过氧化氢氧化修饰 SOD 的疏水层析

—: 天然 SOD, — · — · —: SOD 经 1mmol/L H₂O₂ 处理, ----: SOD 经 5mmol/L H₂O₂ 处理,: (NH₄)₂SO₄ 洗脱曲线。A: 亲水型 SOD, B: 天然 SOD, C: 疏水型 SOD。

2.2 SOD 的比活

用化学发光法测得了亲水型 SOD 和疏水型 SOD 的酶活力,结果如表 1 所示,亲水型 SOD 和疏水型 SOD 均低于天然 SOD,其中尤以疏水型 SOD 显著。

表 1 天然 SOD 及亲水型和疏水型 SOD 比活

SOD	比活 ¹⁾ /U · mg ⁻¹
天然	3280 ± 220
亲水	980 ± 103 ²⁾
疏水	605 ± 74 ²⁾

¹⁾ $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ²⁾ $P < 0.005$.

2.3 SOD 的酶解

天然 SOD 及抗坏血酸-Fe(Ⅲ)处理后所得到的亲水型 SOD 均不易被胰蛋白酶和胃蛋白酶所降解(图 3 和图 4)。同样, H₂O₂ 处理后所

形成亲水型 SOD 也不易被水解,但疏水型 SOD 易被水解。由此可见蛋白水解酶能特异地识别疏水型 SOD 并将其降解。我们考虑疏水型 SOD 易被蛋白酶水解的原因可能是由于构象改变有利于酶与底物之间相互作用,另外,疏水性的增强也有利于酶和底物的结合。详细机理尚待进一步探讨。

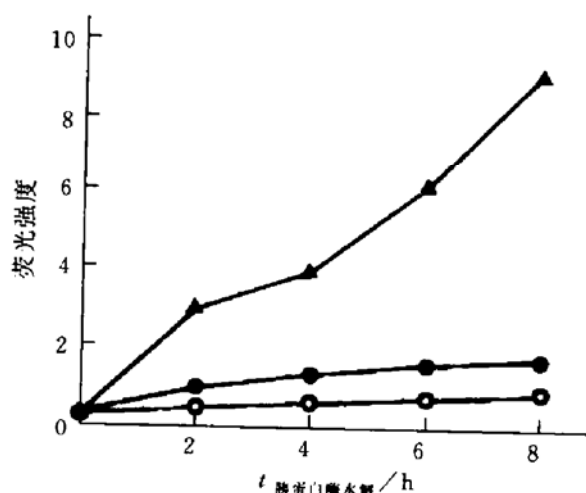


图 3 各种形式 SOD 对胰蛋白酶水解敏感性的比较

○—○: 天然 SOD, ●—●: 亲水型 SOD, ▲—▲: 疏水型 SOD。

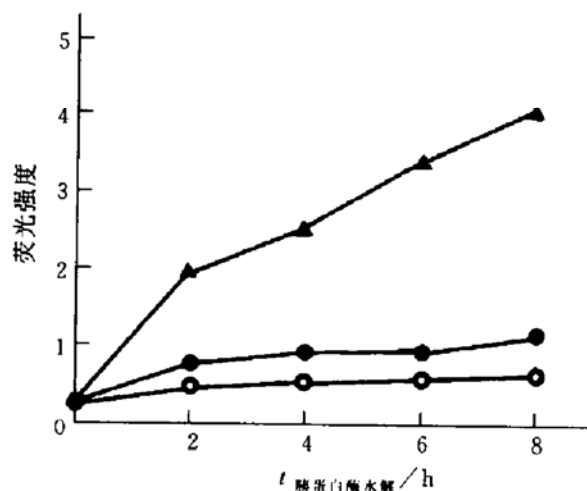


图 4 各种形式 SOD 对胃蛋白酶水解敏感性的比较

○—○: 天然 SOD, ●—●: 亲水型 SOD, ▲—▲: 疏水型 SOD。

SOD 在细胞内合成与降解处于动态平衡状态,有关 SOD 降解的途径目前知之甚少。活性氧不仅能造成 SOD 结构和功能的变化^[3,5],

从本实验来看,还可使 SOD 转变成疏水型,后者可被蛋白水解酶特异地识别并降解.新近研究发现哺乳类动物细胞内存在一种蛋白酶,它专门识别活性氧化修饰后蛋白质并将其降解^[10].因此,我们推测活性氧对 SOD 氧化修饰在调节 SOD 代谢过程中具有重要意义,有关疏水形式 SOD 可被蛋白水解酶识别的进一步机理仍在研究中.

参 考 文 献

- 1 Hodgson E K, Fridovich I. *Biochemistry*, 1975; **14**: 24
- 2 李培峰,方允中. *生物化学杂志*, 1993; **9**: 411
- 3 Li P F, Fang Y Z, Lu X. *Biochem Mole Biol Intern*, 1993; **29**: 929
- 4 Li P F, Fang Y Z, Li Y Z. *Med Sci Res*, 1993; **21**: 521
- 5 李培峰,方允中,陈吉中等. *生物化学杂志*, 1993; **9**: 417
- 6 Reiss R. *Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase*. New York: Elsevier Press, 1980: 286
- 7 Salo D C, Lin S W, Pacifici R E *et al.* *Free Radical Biol Med*, 1988; **5**: 335
- 8 Boheln P, Stein S, Dairman W *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1973; **155**: 213
- 9 李益新,方允中. *生物化学与生物物理进展*, 1983; (2): 59

10 Davis K J A. *Free Radical Biol Med*, 1986; **2**: 155

The Hydrophobicity Changes of Superoxide Dismutase Caused by Reactive Oxygen Species .

Li Peifeng, Fang Yunzhong (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract To study the mechanism of the susceptibility changes of cupro-zinc superoxide dismutase (SOD) to proteases induced by reactive oxygen species is the aim of this work. By hydrophobic chromatography, hydrophilic and hydrophobic form of SOD was isolated from SOD modified by hydrogen peroxide or ascorbate-Fe (Ⅲ) system. The hydrophobic form of SOD demonstrated a high proteolytic susceptibility to trypsin and pepsin than both the native and hydrophilic form of SOD. The results suggested that the increased hydrophobicity of SOD might be responsible for its high susceptibility to proteases.

Key words cupro-zinc superoxide dismutase, reactive oxygen species, hydrophobic chromatography

W/O 微乳液中糖化酶的研究*

李干佐 任学贞 刘 燕

(山东大学化学院, 济南 250100)

汪复宁 郑红英

(山东大学生物系, 济南 250100)

摘要 在十六烷基三甲基溴化铵/正戊醇/异辛烷/水体系中,选取 W/O 型微乳液作为糖化酶的微环境,研究了其催化活性.并与其在水溶液中进行比较.结果表明,在微乳液中,糖化酶催化淀粉水解反应的最佳反应温度和 pH 比在水溶液中低.反应的最大速度 V_m 和米氏常数 K_m 比其在水溶液中分别提高了近 6 倍和 3 倍.

关键词 微乳液,糖化酶,酶催化,十六烷基三甲基溴化铵

表面活性剂(助表面活性剂)/油/水形成的反胶束,微乳液等微环境与生物膜相似,通常作为生物膜的模拟物^[1].因此,微环境中的酶学研究比自由酶(即从生物体中分离出来的

“纯”酶)在水(缓冲液)中的研究,更接近酶

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期:1994-01-18,修回日期:1994-03-17