

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

*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

酸被修饰后, 酶的电荷结构遂发生变化, 从而影响到酶分子电场. 使用 FDPB 方法 (有限差分法求解 Poisson-Boltzman 方程) 计算了酶修饰前后的静电场变化, 以及对维持酶的结构稳定起重要作用的 Cu, Zn 配位结构的影响. 结果表明, Cu, Zn 配位体的两级离解常数在酶修饰后分别约下降 10^3 , 10^6 .

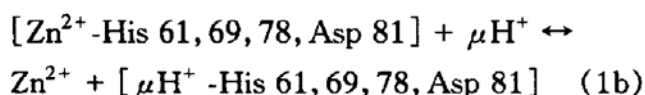
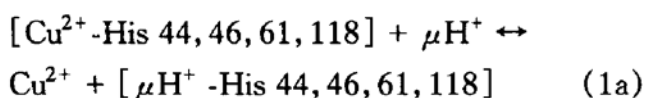
关键词 酶稳定性, FDPB 方法, 超氧化物歧化酶, 化学修饰

超氧化物歧化酶 (EC 1.15.1.1) 是清除超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的金属酶 [1]. 天然酶在体内半衰期仅 5~10 min, 为增加其稳定性, 可对酶表面的赖氨酸进行化学修饰 [2]. 常见的修饰剂有聚乙二醇, 淀粉等, 最近报道使用小分子月桂酸作修饰剂, 也取得了较好效果 [3].

SOD 的一个重要特点就是金属辅基对其结构的稳定作用. 虽然 Cu, Zn SOD 与去金属的酶蛋白在中性 pH 条件下具有相同的构象, 但在各种变性因素作用下, 天然酶比去金属酶蛋白显示出特殊的稳定性, 前者的稳定性与 Cu, Zn 配位结构的存在密切相关 [4]. 赖氨酸在生理的 pH 条件下其侧链上的 Nz 原子常质子化, 带一个正电荷. 酶被修饰后, Nz 原子生成酰胺, 失去正电荷, 酶的电荷分布遂发生变化, 从而导致静电场的变化. 针对 Cu, Zn 离子与其配体, 本文采用 FDPB 方法计算了静电作用对酶修饰前后 Cu, Zn 配位结构的影响, 及其离解常数 K 的变化.

1 模型与方法

从牛血红细胞中提取的 Cu, Zn-SOD 由两个相同的亚基组成, 每个亚基含 151 个氨基酸残基. 已于 1982 年得到 0.2 nm 分辨率晶体结构 [5], 其中 Cu^{2+} 离子分别与 His 44、His 46、His 61 及 His 118 配位, Zn^{2+} 离子与 His 61、His 69、His 78 及 Asp 81 配位. 在溶液中存在以下平衡.



式 (1) 表示了天然酶与去金属酶蛋白之间的平衡. 其中也有组氨酸的质子化过程. 式

中 SOD 有三种可能状态, 即天然酶 (E), 去金属酶蛋白 (P), 及单一金属离子存在的过渡态 (T). 根据组氨酸侧链咪唑基的电离常数可以得出, 在 (E) 中, 组氨酸中未与铜, 锌离子配位的 N 原子是质子化的 [6], 即 His 44、46、69、78 和 118 是电中性的, His 61 由于同时与铜, 锌离子配位而带一个负电荷, Asp 81 带一个负电荷, 整个配位结构净电荷为 +2. 在 (P) 中所有咪唑基处于自由状态, 均不带电荷, 只有 Asp 81 是电离的, 配位结构净电荷为 -1. 在 (T) 中只有 Asp 81 带电, 加上一个金属离子, 配位结构净电荷为 +1. 即 μ 在 (E-T) 与 (T-P) 两步中分别为 1 和 0.

此反应的自由能变化为:

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{ele} \quad (2)$$

其中 ΔG_0 是外电场为 0 时的自由能变化, ΔG_{ele} 为外电场的自由能变化值, 来源于金属离子及反应中的 H^+ 在溶液环境及配位状态下的静电势能差值. 设金属离子配位处静电势为 φ . 则

$$\Delta G_{ele} = (\mu - Z)q\varphi \quad (3)$$

其中 Z 为金属离子的电荷数, 此处为 2, q 为质子电量. Cu 及 Zn 配合物离解常数的变化如下式

$$\begin{aligned} \Delta pK &= \Delta \Delta G / (2.303 RT) \\ &= \Delta \Delta G_{ele} / (2.303 RT) \\ &= (\mu - Z)q(\varphi_m - \varphi_0) / (2.303 RT) \\ &= (\mu - Z)q \sum (\varphi_{mi} - \varphi_{0i}) / (2.303 RT) \end{aligned} \quad (4)$$

φ_0 及 φ_m 分别是酶修饰前后金属离子配位处的静电势, 可以写成每个修饰赖氨酸贡献的加和. 这里, $(\varphi_{mi} - \varphi_{0i})$ 通过 FDPB 方法求算. 在溶液状态下的蛋白质的内部及外部的静电场符合 Poisson-Boltzman 方程 [7].

$$\nabla \epsilon(r) \nabla \varphi(r) - \epsilon(r) \kappa^2(r) \sinh(\varphi(r)/kT) = 4\pi\rho(r) \quad (5)$$

$$\epsilon\kappa^2 = 8\pi e^2 NI/kT \quad (6)$$

其中 φ 是静电势, ϵ 是介电常数, κ 是 Debye-Huckel 常数, ρ 是电荷密度, e 是电子电量, N 是阿佛加德罗常数, I 是离子强度, k 是 Boltzman 常数, T 是绝对温度. 在蛋白质溶剂可及表面^[8]之内介电常数 ϵ_p 取 4, 溶剂水的 ϵ_s 为 80. 溶剂可及表面以外的平均离子半径 (0.2 nm) 为厚度的区域为盐离子禁区^[9], 在盐离子禁区外 κ 按式 (6) 计算, 其他区域 κ 为 0. 方程 (5) 的求解使用有限差分法^[10,11], 即在空间划分一定密度的三维网格, 将 ρ 、 κ 、 ϵ 分配到网格点上, 通过迭代得到 φ . 所用程序为本实验室开发的大分子静电势软件包 MMEP^[12], 在 SGI 工作站上进行.

Cu, Zn SOD 的坐标取自晶体结构, 并在此基础上进行了初步的能量优化, FDPB 计算中, 网格为 $96 \times 100 \times 76$, 网格间距为 0.0941 nm. 由于 FDPB 是一种数值方法, 其计算结果与网格有关, 故 SOD 和修饰 SOD 必须使用相同的骨架和网格, 其间构象差异归入到介电常数之中考虑. 因修饰 SOD 的赖氨酸侧链不带电荷, 对静电作用无贡献, 计算中不包含修饰链.

2 结果与讨论

2.1 Cu, Zn 配位体解离常数的变化

在中性 pH 值及生理条件下的离子强度 (0.145 mol/L) 下, 每个赖氨酸 Nz 上的单位电荷在 Cu、Zn 处产生的静电势见表 1. 从表 1 看, 对金属离子的静电贡献主要来自几个与其距离较近的赖氨酸, 以亚基 1 为例, 对 Cu 离子影响较大的是 Lys 73 (距离 1.467 nm), Lys 120 (距离 1.127 nm), Lys 134 (距离 1.262 nm). 对 Zn 离子影响较大的是 Lys 67 (距离 1.242 nm), Lys 68 (距离 1.193 nm), Lys 73 (距离 1.397 nm), Lys 120 (距离 1.306 nm), Lys 134 (距离 0.991 nm).

表 1 修饰赖氨酸对金属离子的静电影响

(kJ/mol)

	Cu ¹⁾	Cu ²⁾	Zn ¹⁾	Zn ²⁾
¹⁾ Lys 3	0.486	0.317	0.239	0.214
¹⁾ Lys 9	1.324	0.248	0.427	0.093
¹⁾ Lys 23	0.567	0.182	0.317	0.130
¹⁾ Lys 67	1.434	0.021	3.599	0.012
¹⁾ Lys 68	0.871	0.012	2.720	0.006
¹⁾ Lys 73	4.054	0.089	3.921	0.045
¹⁾ Lys 89	0.121	0.007	0.064	0.004
¹⁾ Lys 120	5.206	0.033	2.995	0.014
¹⁾ Lys 134	2.316	0.024	4.502	0.011
¹⁾ Lys 151	0.148	0.421	0.071	0.369
²⁾ Lys 3	0.372	0.442	0.245	0.214
²⁾ Lys 9	0.292	1.703	0.110	0.535
²⁾ Lys 23	0.087	0.753	0.053	0.496
²⁾ Lys 67	0.022	1.247	0.012	3.565
²⁾ Lys 68	0.012	0.837	0.006	2.663
²⁾ Lys 73	0.019	1.819	0.009	3.014
²⁾ Lys 89	0.010	0.297	0.005	0.147
²⁾ Lys 120	0.035	6.088	0.015	3.633
²⁾ Lys 134	0.024	2.933	0.011	6.644
²⁾ Lys 151	0.736	0.087	0.637	0.039
总和	18.134	17.559	19.957	21.847

¹⁾为亚基 1, ²⁾为亚基 2.

当赖氨酸均被修饰时, 使用式 4 可以得到 Cu, Zn 配位体一级 (E-T) 和二级 (T-P) 离解常数的变化 (ΔpK), Cu1 的两级 ΔpK 分别为 3.157、6.314, Cu2 为 3.057、6.114, Zn1 为 3.475、6.949, Zn2 为 3.804、7.607. 即一级二级离解常数在修饰后分别下降 $10^3 \sim 10^4$, 及 $10^6 \sim 10^7$.

2.2 构象变化的影响

在构成蛋白质的 20 种氨基酸中, 赖氨酸的侧链是柔性最大的, 由于其高运动性, 使侧链末端 Nz 原子与 Cu, Zn 离子间的静电作用会有比较明显的波动. 特别是对于距离 Cu, Zn 离子较近的赖氨酸, 如 Lys 120, Lys 134 等. 本文对 SOD 体系进行了分子动力学模拟考察构象变化对静电作用的影响.

分子动力学的初始坐标是在晶体结构基础上经能量优化得到的, 在优化和分子动力学模拟过程中, 加入厚度为 1.0 nm 的溶剂水分子. 为保持酶结构的合理性, 对酶的骨架和活性部

位加上能量限制项. 分子动力学初始温度为 300 K, 用 Maxwellian 方法分配初始速度, 加上温度的 Coupling 项以控制体系温度, 平衡 20 ps, 时间间隔为 0.001 ps, 每 0.1 ps 记录一次坐标, 共记录 200 个构象, 然后从每 20 个构象中求出平均构象, 这样得到在溶液状态下 SOD 的 10 个可能构象. 构象骨架偏差 0.186 nm. 对这 10 个构象分别进行 FDPB 计算. 所有赖氨酸在不同构象下对 Cu、Zn 离子的静电作用之和见表 2.

表 2 分子动力学模拟中所有修饰赖氨酸对金属离子的静电影响贡献加和

(kJ/mol)				
<i>t</i> /ps	Cu ¹⁾	Cu ²⁾	Zn ¹⁾	Zn ²⁾
0~2	20.040	18.995	23.547	27.058
2~4	20.290	23.038	23.505	31.301
4~6	22.940	24.079	28.383	29.952
6~8	21.861	24.072	27.497	30.053
8~10	22.801	26.245	30.134	30.812
10~12	22.429	25.513	30.236	31.343
12~14	23.225	23.729	30.875	27.528
14~16	23.287	23.817	31.130	27.425
16~18	22.785	23.086	30.619	27.427
18~20	24.177	23.349	30.977	27.059

由表 2 可以看出, 随着赖氨酸侧链的无规则热运动, 其对 Cu、Zn 离子的静电作用在一定范围内波动. 这些数值有一定的随机性, 与分子动力学的参数 (如温度, 初始速度分配) 有关, 但它们仍能从统计意义上反映分子振动的影响. 波动的幅度为 Cu1 4.13 kJ/mol, Cu2 7.25 kJ/mol, Zn1 7.825 kJ/mol, Zn2 4.285 kJ/mol. 对 Cu、Zn 配位结构的一级离解常数的影响约为 1 个 pK 单位.

2.3 离子强度的影响

溶液中的离子对电场具有屏蔽作用. 蛋白质内部两点间的静电作用也因这种屏蔽而减弱, 距离介电边界越近这种作用越明显. 由于赖氨酸一般均处在蛋白质表面, 受溶液环境影响

较大, 所以本文在不同离子强度下计算了修饰赖氨酸对 Cu、Zn 离子的静电作用 (表 3). 可见离子强度的影响是比较明显的, 从 0.01 mol/L 到 0.1 mol/L, 静电作用下降近 20%.

表 3 不同离子强度下所有修饰赖氨酸对金属离子静电作用的贡献加和

(kJ/mol)				
离子强度 /mol·L ⁻¹	Cu ¹⁾	Cu ²⁾	Zn ¹⁾	Zn ²⁾
0.01	22.017	21.595	23.809	25.949
0.05	19.535	19.031	21.354	23.360
0.10	18.609	18.057	20.431	22.362
0.145	18.134	17.559	19.957	21.847
0.50	16.789	16.171	18.604	20.396

SOD 通过与 Cu、Zn 的配位, 蛋白骨架之间产生多处缔合, 酶骨架在各种变性条件下不容易打开成为松散的肽链, 使其构象 (特别是活性部位附近) 保持相对稳定. SOD 表面的赖氨酸被修饰之后, 与酶配位的 Cu、Zn 离子处的静电势向负方向移动, 从而更加稳定了 Cu、Zn 离子. 使配位结构的二级离解常数分别下降大约 10³ 和 10⁶. 对 Cu、Zn 配位结构的加固直接对酶起到了稳定的作用. 另一方面, Cu 离子是酶的活性中心, 其附近活性部位的稳定对酶活性的保留也至关重要. 这种作用受到构象及离子强度等条件的影响, 其中构象的影响较大.

参 考 文 献

- McCord J M, Fridovich I. J Biol Chem, 1969; 224: 6049
- 杨保珍, 张天民. 中国医药工业杂志, 1990; 21: 519
- 阎家麒, 谢文正, 生物化学与生物物理进展, 1994; 21: 154
- 李益新. 生物化学与生物物理进展, 1985; 12: 15
- Tainer J A, Getzoff E D, Beem K M *et al.* J Mol Biol, 1982; 160: 181
- Getzoff E D, Tainer J A, Weiner P K *et al.* Nature, 1983; 306: 287
- Sharp K A, Honig B. Annu Rev Biophys Biophys Chem,

- 1991; 19: 301
- 8 Lee H, Richards F M. J Mol Biol, 1971; 55: 379
- 9 Klapper I, Hagstrom R, Fine R *et al.* Proteins, 1986; 1: 47
- 10 Warwicker J, Watson H C. J Mol Biol, 1982; 157: 671
- 11 Gilson M, Sharp K A, Honig B. J Comp Chem, 1987; 9: 327
- 12 李维忠, 王瑾玲, 刘小兰等. 化学通报, 1996; (3): 58

Electrostatics and Stability of Modified Copper, Zinc Superoxide Dismutase. Li Weizhong, Miao Fangming (*Institute of Chemical Crystallography, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China*).

Abstract After the lysines on the surface of

Cu, Zn superoxide dismutase are modified, the enzyme stability increases remarkably. The rearrange of charge structure of the enzyme due to modification results in the change of enzyme electrostatic field. The finite difference solution to the Poisson-Boltzman method is used to calculate the change of electrostatic field and the effect on Cu, Zn ligand structure which play an important role to stabilize the enzyme. The results show the first and second decomposition constants of Cu, Zn ligand complex are reduced by 10^3 and 10^6 after modification respectively.

Key words enzyme stability, FDPB, superoxide dismutase, chemical modification

枸橼酸酐对原核表达重组 GM-CSF 的修饰作用

冯 丹 袁 勇 张颖妹 冯 岚 范 慧 狄春辉 宋泉声 马大龙

(北京医科大学免疫学系, 北京 100083)

摘要 根据枸橼酸酐对蛋白质中的游离氨基进行化学修饰后可使蛋白质溶解度提高的原理, 以大肠杆菌表达的人重组 GM-CSF 为模型, 研究了枸橼酸酐修饰对含凝血酶识别位点的融合蛋白的作用, 发现用微量枸橼酸酐修饰的重组 GM-CSF 变性、复性更容易, 溶解度明显提高, 并对凝血酶的消化更为敏感, 使凝血酶用量降低 100 倍. GM-CSF 活性测定结果证明枸橼酸酐修饰不影响其生物学活性. 这些结果为枸橼酸酐修饰法在大肠杆菌表达重组蛋白纯化中的应用提供了新途径.

关键词 枸橼酸酐, GM-CSF, 凝血酶, 蛋白修饰

在大肠杆菌中表达的外源基因产物多以包涵体形式存在于胞浆内, 必须经变性、复性后才可能成为具有生物学活性的可溶性蛋白. 在复性过程中往往会出现大量的重组蛋白的沉淀, 造成蛋白质回收率降低. 此外, 为了提高外源基因的表达效率, 许多研究者采用了表达细菌蛋白与目的蛋白的融合分子的战略, 并在二种蛋白质之间设计蛋白水解酶位点, 在蛋白酶的作用下去除细菌蛋白^[1]. 可选择的蛋白水解酶有胰蛋白酶、凝血酶、Xa 因子等. 本室采用在细菌蛋白与目的蛋白之间导入凝血酶切点的方法, 已成功地表达了人白细胞介素 3

(IL-3)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-8 等多种细胞因子^[2~4]. 但如重组融合蛋白复性不好时, 凝血酶的切割效率明显下降. 为解决上述问题, 我们根据枸橼酸酐对蛋白中 Lys 残基进行化学修饰后可使蛋白质溶解度提高的原理^[5], 以我室在大肠杆菌表达的人重组 GM-CSF 为模型, 研究了枸橼酸酐修饰对含凝血酶识别位点的大肠杆菌表达融合蛋白的作用, 发现用微量枸橼酸酐修饰的重组 GM-CSF 变性、复性更容易, 溶解度明显