

大鼠甘氨酸酰化单氧酶在 CHO 细胞中的活性表达 及在体外酰胺化修饰中的应用

江智红 杨宇虹 徐来根 杨新颖 夏其昌 李伯良* 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将大鼠脑 cDNA 库来源的 PAM 基因片段,经克隆重组,构建成真核表达质粒 pSV-PAM,并转染 CHO 细胞,获得在 CHO 中稳定表达活性型 α -酰胺化酶的细胞株 DGAE。表达产物为双功能酶,分泌至培养基中的酶活力远高于胞内。体外酰胺化加工研究表明,以 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 为底物,该酶催化反应的 K_m 为 $12.5\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 $180\mu\text{mol/mg/h}$,而且催化反应中表现有最适铜离子浓度和 pH 值范围。表达的双功能酶可直接用于合成的多肽和基因工程表达产物的酰胺化加工修饰。

关键词 酰胺化, PAM, 活性表达, 双功能酶

学科分类号 Q516

生物活性肽,包括起远程通讯作用的激素和近程通讯作用的神经递质及营养因子,在生物体内有着很重要的生理功能。这些活性肽在其生物合成中,有一半以上需要在 C 末端形成酰胺化结构,这对它们的生物活性和稳定性都是极为重要的^[1]。在生物体内,酰胺化反应是由酶催化的蛋白翻译后加工过程,参与此反应的 α -酰胺化酶最早由 Bradbury 等 1982 年在猪垂体中发现并纯化^[2],由 Glembotski 等命名为甘氨酸酰化单氧酶(Peptidylglycine α -amidating monooxygenase, PAM, ECl. 14.17.3)^[3]。PAM 在不同组织中的存在形式多种多样,分子量从 38kDa 到 108kDa 不等,并表现出不同的最适 pH 值,但它们在结构上仍具有很高的同源性,催化反应都需要适量铜离子、抗坏血酸和分子氧作为辅助因子^[3]。到目前为止,人、牛、大鼠、小鼠和蛙的 PAM cDNA 均有被克隆^[4-8]。对它们基因结构及编码氨基酸的序列分析显示,PAM 在 RNA 及蛋白水平上均有多种形式的加工。大鼠中至少有两种主要的 mRNA 编码的酰胺化酶:PAM-1 和 PAM-2(图 1A),其中最大的蛋白—PAM-1 含有信号肽、前导肽、催化结构域、跨膜区和 C 端胞质区。PAM 是在多肽生物合成中被发现的第一个双功能酶,有两个催化结构域:氧化酶(PHM)和裂解酶(PAL),生理条件下顺序催化酰胺化的两步反应:甘氨酸在氧化酶的作用下,形成 α -羟化甘氨酸中间体;然后在裂解酶的作用下,中间体转化为酰胺化产物和乙醛酸。

由于 C 末端酰胺化残基对许多活性肽的生物活性是极为重要的,而这些多肽大多数又是有效的药品,如降钙素、胃泌素、生物激素释放因子、神经肽 Y、杀菌肽等。它们直接

国家“863”高技术研究发展计划资助,项目编号为:863-102-11-03-02。

* 通讯联系人。

收稿日期:1997-04-21,修回日期:1997-11-17。

从生物体内分离提取, 毕竟来源有限, 而用基因工程表达方法生产的多肽, 其 C 端都是以羧基结尾的非酰胺化产物。这些产物与天然结构相比, 生物活性显著下降, 甚至表现为无生物活性。因此基因工程表达产物的 C 末端酰胺化则成为一个关键性的问题, 从而使酰胺化酶的开发研究就显得十分必要。PAM 可以从含量及活性高的组织中分离纯化, 比如血清、人甲状腺、蛙皮、大鼠髓样甲状腺瘤组织及细胞株、猪心房、猪垂体^[9~15]等, 这方面国际上已有不少专利报道。但从天然组织中提取酰胺化酶, 受到材料来源的限制, 而且纯化产物往往带有组织中的蛋白酶的污染, 在对多肽的修饰过程中, 造成对底物、酰胺化产物以及酶本身的降解。用基因工程方法生产 α -酰胺化酶, 是另一条途径。PAM 全酶有 14 个 Cys, 形成 7 对二硫键, 在大肠杆菌中还未见有活性表达的报道, 复性也极为困难。在此, 我们把从鼠脑 cDNA 库中克隆到的 PAM 全酶编码基因, 经重组改造, 转入 CHO 细胞株, 表达得到活性型 α -酰胺化酶, 可直接用于 C 端为 Gly 的多肽及蛋白的酰胺化修饰。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 JM83、MC106(P3) 和质粒 pSVK3、pcDNA I/neo 为本实验室保存, 细胞株 CHO 为本实验室培养并保存。限制酶和细胞培养用的培养基 F12、胎牛血清、胰蛋白酶、G418、脂质体 Lipofectamine 均为 GIBCO BRL 公司产品。Na¹²⁵I 由 Amersham 公司提供, Na(TESE)、Na(MES)、Triton X-100、DAB 为 Sigma 公司产品, IODO-GEN 购自 Pierce 化学公司。 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 三肽由本所陈韵能副研究员合成。28 肽 (Ser-Thr-Pro-Leu-Met-Ser-Trp-Pro-Trp-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Pro-Glu-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Gly) 为本所崔大敷副研究员合成并惠赠。Sephacryl S4B 为 Pharmacia 公司产品。毛细管电泳仪为 ABI 270A 型 (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer 公司), 毛细管内径 50 μ m。总长度 72cm, 有效长度 50cm。HPLC 采用的是 KONTRON 高压二元梯度 HPLC 系统-DAD 型。

1.2 方法

1.2.1 重组克隆及质粒 DNA 的纯化: 质粒 DNA 的制备、限制酶酶解反应、琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段回收、T4 连接酶连接反应、大肠杆菌转化等均照 Molecular Cloning 实验手册^[16]稍作修改进行。重组质粒经 Sepharose 2B 柱纯化后, 用于转染细胞。

1.2.2 细胞培养、脂质体法转染及稳定表达酰胺化酶细胞株的筛选: 中国仓鼠卵巢细胞 CHO 培养于含 10% 胎牛血清的 F12 培养基中, 按 Lipofectamine 产品说明推荐方法, 将 3 μ g pSVPAM 质粒 DNA 与 0.3 μ g pcDNA I/neo 在 Lipofectamine 介导下共转染 CHO 细胞, 40h 后, 培养基中加入 G418 至终浓度为 0.4mg/ml 进行筛选。将抗药克隆转移至 96 孔板中, 继续培养, 并吸取其培养基测定酰胺化酶活性。三轮亚克隆后, 获得稳定表达活性酰胺化酶的细胞株。

1.2.3 测活样品的制备和酶活测定: 测活前 12h, 细胞换无血清培养基 CHO-SFM。收集培养基, 离心去除细胞碎片, 用于胞外酶样品的制备。贴壁细胞用 D' hanks 洗一次, 刮下细胞, 悬浮于 20mmol \cdot L⁻¹ Na(TESE), pH 7.5, 10mmol \cdot L⁻¹ 甘露醇, 1% Triton X-100 溶液中, 液氮中冻融 3 次, 14 000r/min 离心 15min, 吸取上清, Bradford 法测定蛋白浓度, 用

于胞内酶样品的制备。测活反应所用底物为 ^{125}I - α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly, 碘标采用 IO-DO-GEN 法, $40\mu\text{l}$ 酶活测定反应体系中, 含有 $25\mu\text{mol/L}$ 底物, $1\sim 2\mu\text{g}$ 胞内蛋白样品或 $10\mu\text{g}$ 胞外酶样品, 120mmol/L Na(MES) pH6.0, $1\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 1mmol/L 抗坏血酸, 和 0.25mg/ml 过氧化氢酶。样品均以平衡双份在 37°C 保温 4h。反应结束加入 $10\mu\text{l}$ 1mol/L NaOH 混匀, 并用 0.05% 三甲胺饱和的乙酸乙酯抽提, 吸取上层有机相, 测 γ 计数。

1.2.4 免疫印记法检测表达产物: 胞内蛋白样品 $40\mu\text{g}$ 和浓缩 10 倍的胞外酶样品 $10\mu\text{l}$ 分别与 Laemmli 上样缓冲液混合后, 沸水浴 5min, 进行 SDS-PAGE。电泳毕, 蛋白电转移至硝酸纤维素滤膜上, 经小牛血清封闭、PAM-N260 抗血清(图 1A, 文献[17])和辣根过氧化物酶标记的蛋白 A 反应后, 用二氨基联苯(DAB)、 H_2O_2 显色。

1.2.5 毛细管电泳检测酰胺化加工产物: 浓缩的胞外酶样品 $10\mu\text{l}$ 与 $160\mu\text{g}$ 人工合成的 28 肽 (Ser-Thr-Pro-Leu-Met-Ser-Trp-Pro-Trp-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Pro-Glu-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Gly) 保温 $3\sim 5\text{h}$ 后, $15\ 000\text{r/min}$ 离心 10min, 用毛细管区带电泳(CZE)方法分析产物。电泳缓冲液为 25mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH4.5, 真空进样 1.0sec ($\sim 3.5\text{nl}$), 电压 20kV , 电流 $10\mu\text{A}$, 恒温 30°C 。

1.2.6 酰胺化加工产物的 HPLC 分离和质谱分析: 经毛细管电泳分析后余下的 28 肽加工产物用 HPLC 进行分离纯化, 所用柱为 ABI 公司的 RP-18 Spheri-5 ($4.6\times 100\text{mm}$), A 液为 0.1% 三氟乙酸, B 液为 70% 乙腈, 214nm 检测。将 28 肽及其经酰胺化酶修饰的产物分别进行质谱分析, 采用 ESI 方法, 由中国科学院上海有机所的徐永珍测定。

1.2.7 基因工程表达蛋白的酰胺化修饰及 C 末端分析: 0.375mg PABC-hGRF(Gly)(人生长激素释放因子与蛋白 A 的 BC 结构域在大肠杆菌中的融合表达产物, GRF 的 C 端比天然的多一个 Gly)与 $15\mu\text{l}$ 浓缩 10 倍的胞外酶样品 $100\mu\text{l}$ 反应体系中含 120mmol/L Na(MES) pH6.0, $1\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 1mmol/L 抗坏血酸, NEMI 0.5mmol/L 和 0.25mg/ml (过氧化氢酶) 37°C 保温 5h 后, 凝胶 HPLC(缓冲液为 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠, $0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 流速 0.7ml/min) 分离产物, 经 N 端氨基酸序列分析对产物进行确证和定量后, 对应进行 C 端序列分析。

3 实验结果

3.1 大鼠 PAM 的真核表达质粒构建和 CHO 细胞株的建立

来源于大鼠 cDNA 库并含信号肽、前导肽部分的 PAM 5' 端基因片段 I, 与不含信号肽编码区的 PAM 全酶编码基因 II (图 1B), 通过 NdeI 酶切位点重组, 获得含信号肽的全酶编码序列。PHM 和 PAL 编码区之间无 Exon A, 衔接处的 CCT(Pro) 为克隆中引入, 跨膜区也在重组中被去掉。将此 PAM 基因插入 pSVK3 真核表达载体中, 获得 SV40 启动子控制下的表达质粒 pSVPAM(图 1C)。

大鼠 PAM 真核表达质粒 pSVPAM 和带有新霉素抗性基因的真核表达质粒 pcDNA1/neo, 在脂质体介导下共转染 CHO 细胞, 40h 后加入 G418 筛选。两星期后, 未转染质粒的对照组细胞全部死亡, 而转染了质粒的细胞还有部分存活。转移单克隆细胞群落至 96 孔板中, 细胞扩增后, 分别测定各孔培养基上清中酰胺化酶活性。将酶活性最高孔中的细胞, 再在 96 孔板中进行亚克隆, 经三轮筛选, 获得稳定表达高活性大鼠 PAM 的

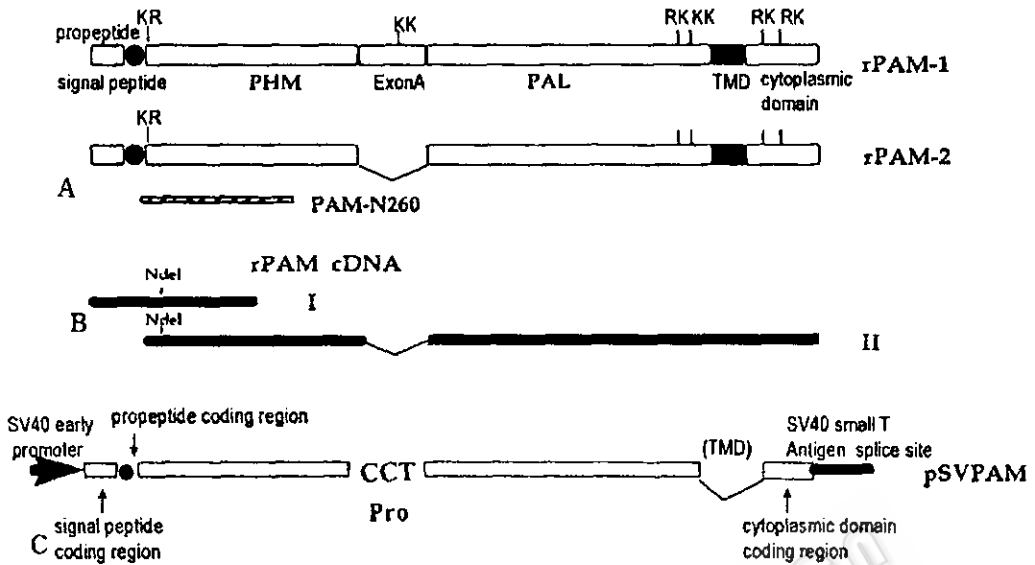


图1 大鼠 PAM-1、PAM-2 的结构(A)及克隆的 PAM cDNA(B)、真核表达质粒 pSVPAM 的线性模式图(C)

Fig.1 Structure of rat PAM-1, -2(A), its recombinant cDNA(B) and linearized diagram of eukaryotic expression plasmid pSVPAM(C)

Signal peptide (crosshatched box), propeptide and transmembrane domain (black box), PHM, PAL, cytoplasmic domain (clear box) and Exon A (stippled) of rPAM are all labeled. Potential dibasic cleavage sites are indicated by vertical lines. The peptide PAM-N260 used to generate antisera is also shown with crosshatched box. Rat cDNA fragments I and II in B are both indicated in ref 17.

细胞株,命名为 DGAE。

3.2 DGAE 表达产物的性质分析与鉴定

DGAE 细胞株长至满瓶,换无血清培养基 12h 后,收集培养基上清和制备细胞内蛋白样品。培养基上清与细胞抽提液经 SDS-PAGE 和 western blot 检测显示(图 2),胞内与胞外培养基中均有明显的能与 PAM-N260 抗血清反应的表达产物。胞外培养基中的蛋白显示一条约 89kDa 的免疫结合条带,而胞内蛋白显示两条特异免疫结合条带,分别对应 84kDa 和 75kDa 的分子量大小,均比胞外培养基中的要小。根据分子量推算,胞内、胞外产物均为全酶,含有氧化酶和裂解酶两个催化结构域。以¹²⁵I 标记的 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 三肽为底物,进行酰胺化激活反应,再在碱性条件下用乙酸乙酯抽提,酰胺化产物 α -N-acetyl-Tyr-Val-NH₂ 疏水性极强,进入有机相,而未反应底物则溶于水相中。对有机相进行 γ 计数,从而推算产物的生成量。活性测定显示(图 3),转有 PAM 基因的细胞株 DGAE 胞内、胞外均有明显的酶活性,远高于对照组未转基因的 CHO 细胞。

3.3 DGAE 表达的酰胺化酶的催化反应特性研究

深入对 DGAE 表达的酰胺化酶的催化反应特性进行了研究。以 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 为底物,对 DGAE 表达并分泌至培养基中的大鼠 PAM 的酰胺化催化反应,进行动力

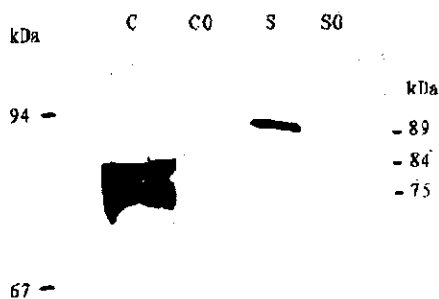


图2 DGAE 胞内及分泌至培养基中蛋白的 western blot 分析

Fig.2 Western blot of cell extracts and secretion proteins from wild type and transfected CHO (DGAE)

Cells were incubated in serum-free medium F12 for 12h. The spent medium was collected and cells were extracted in 20mmol/L Na(TES) pH 7. 5, 10mmol/L mannitol, 1% Triton X-100. 10 μ l ten-fold condensed medium (S) and 40 μ g cell extracts (C) were separated by PAGE. The proteins were transferred to NC membrane, probed with rat PHM antisera, and visualized using HRP-protein A. C0 and S0 as controls are those from wild type CHO.

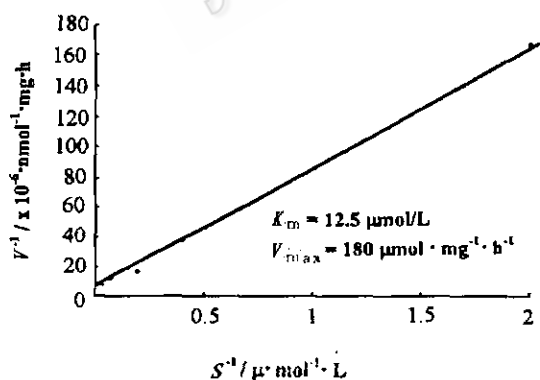


图4 重组 PAM 的动力学分析

Fig.4 Kinetic studies of PAM secreted by DGAE

Assays were incubated for 4h in a 40 μ l reaction mixture containing a constant amount of 125 I - α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly and 10 μ l spent medium of DGAE.

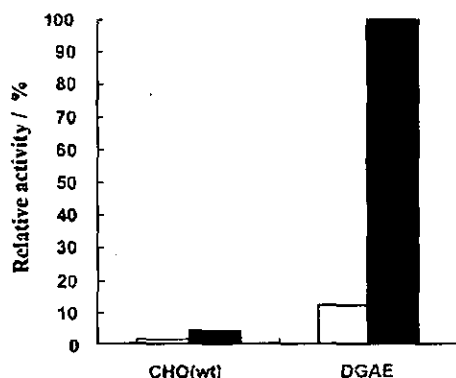


图3 胞内及胞外 PAM 的相对酶活力

Fig.3 PAM relative activity in the medium (■) and cell extracts (□) of wild-type and transfected CHO cells were determined

学分析,考察底物浓度与酶反应的关系。酶的催化反应行为符合 Michaelis-Menten 动力学特征(图4)。经计算,DGAE 表达分泌的 PAM 对 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 酰胺化的 K_m 约为 12.5 μ mol/L, V_{max} 达 180 μ mol/mg/h。

PAM 的催化反应有着其最适 pH 值,这与酶的来源和底物的选择都有关系。以 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 为底物,选用转大鼠 PAM 基因的细胞株 DGAE 所分泌的酰胺化酶,催化反应最适 pH 值约为 6.0(图 5A)。

PAM 是一种铜离子依赖的酶,催化反应中需要适量铜离子作为辅助因子。点突变实验揭示,大鼠 PAM 中,His107、His108、His172、His243、His244 可能是铜离子的配位点^[18]。在以前的文献报道中,不同来源的酰胺化酶,其催化反应中所需最适铜离子浓度都不尽相同,如大鼠脑垂体来源的酰胺化酶,最适铜离子浓度为 2~30 μ mol/L 不等,猪垂体来源的为 5 μ mol/L。本实验中,转大鼠 PAM 基因的细胞株 DGAE 所表达的酰胺化酶,以碘标三肽 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 为底物,在体外酰胺化加工中也表现出

铜离子依赖性, 其所需最适铜离子浓度约为 $1\mu\text{mol/L}$ (图 5B)。

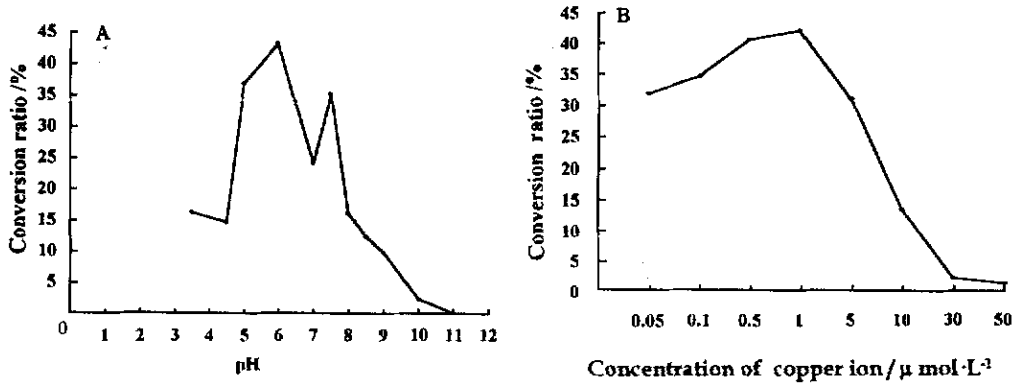


图 5 DGAE 表达的 PAM 的最适反应 pH 值(A)和最适铜离子浓度(B)

Fig. 5 Determination of optimal pH value (A) and copper ion concentration (B) of rat PAM secreted by DGAE

3.4 重组酰胺化酶的体外酶促加工研究

利用重组表达的 PAM, 对人工合成的甘氨酸及基因工程表达的蛋白进行体外酰胺化修饰研究。首先用重组酰胺化酶 $10\mu\text{l}$ 与 $160\mu\text{g}$ 人工合成的 28 肽(Ser-Thr-Pro-Leu-Met-Ser-Trp-Pro-Trp-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Pro-Glu-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Gly)保温 3~5h 后, 经毛细管电泳分析, 可以观察到其酰胺化产物的生成(图 6C 中峰

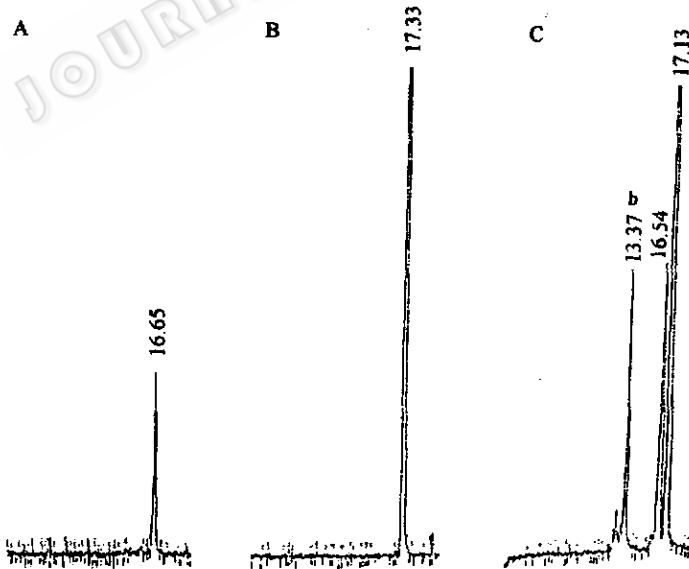


图 6 酰胺化产物的毛细管电泳分析

Fig. 6 Capillary electrophoresis of amidated product from peptide with C-terminal Gly
A. Polypeptide with 28 residues; B. Reaction mixture without substrate; C. Polypeptide with 28 residues was modified with amidating enzyme

b), 转化率达 36.5%。HPLC 分离纯化 28 肽加工产物, 进行质谱分析, 其显示的分子量为 3098.81, 而原 28 肽的分子量为 3157.57(结果未显示), 两者分子量的差别正好与理论推算相符, 证明 28 肽确实已被酶促加工为酰胺化产物。

另外, 还用表达的活性酰胺化酶对基因工程表达的 PABC-hGRF(Gly)(人生长激素释放因子与蛋白 A 的 BC 结构域融合表达产物, GRF 的 C 端比天然的多一个 Gly), 进行酰胺化修饰研究。等量的 PABC-hGRF(Gly)和其酰胺化酶反应产物均经凝胶 HPLC 后, 进行 N 端和 C 端序列分析。结果显示, PABC-hGRF(Gly)与其经酰胺化酶加工产物具有相同的 N 端氨基酸序列(Ser-Leu-), PABC-hGRF(Gly)C 端测出为-Leu-Gly, 与理论相符, 而其经酰胺化酶加工产物 C 端则测不出, 这表明重组酰胺化酶作用于该蛋白 C 端的 Gly。上述通过 N、C 端同时测序对照比较, 证实该酶的 C 端酰胺化加工修饰作用。

4 讨 论

本工作将大鼠脑 cDNA 库来源的 PAM 基因片段, 通过重组克隆, 转入 CHO 细胞, 获得稳定表达双功能酶活性 PAM 的细胞株 DGAE, 并对其表达产物在体外酰胺化方面的应用进行了研究。

PAM 是目前为止在多肽生物合成中第一个被发现的双功能酶, 在组织中或以全酶形式存在, 或分别以独立的 PHM 和 PAL 形式存在。研究中发现, 生理 pH 条件下, 酰胺化反应需要 PHM 和 PAL 的共同作用, 但碱性条件下 PHM 形成的中间产物可自发转化为酰胺化产物, 而不需 PAL 的作用。大鼠 PAM-1 的 ExonA 中唯一的一对双碱性氨基酸(在牛及人的 ExonA 区是没有的), 对于组织特异性加工为独立的 PHM 和 PAL 是十分重要的。DGAE 所表达的 PAM 基因属于 rPAM-2 形式, PHM 和 PAL 之间无 Exon A 区, 表达产物从 western blot 显示的分子量上推算是全酶, 包括两个催化结构域。用同位素标记底物方法进行酶的活性测定时, 为利于底物与产物的分离, 加入了 NaOH, 因而还不能完全肯定表达产物在功能上是否表现双酶特性;但在后面的 28 肽的催化反应中, 并未给予碱性条件, 其毛细管电泳和质谱分析结果均显示了酰胺化产物的生成, 说明 DGAE 表达产物确实为双功能酶。在 PAM 前体蛋白的 C 端有一些双碱性氨基酸, 它们与翻译后组织特异性加工有很大的关系, 实际上, 同种 PAM cDNA 在不同的细胞系中表达, 如 hEK-293 和 AtT-20, 会有不同大小的表达产物^[19]。在我们实验中, CHO 中表达的酰胺化酶, 胞内产物主要为 84kDa 和 75kDa, 而分泌至胞外的为 89kDa, 这种表达产物的分子量差异, 很可能是由于胞内蛋白酶作用下, PAM C 端 KK 和(或)RK 双碱性氨基酸处的不同裂解形式而产生, 这还值得深入研究。

C 端酰胺基团相当稳定, 很难起化学反应, 对其分析鉴定有一定困难。但它与羧基在一定的缓冲液中, 能表现出不同的带电性和疏水性, 实验中用同位素标记底物结合乙酸乙酯抽提及毛细管电泳来测定酰胺化酶活性、分析酰胺化结构的方法, 正是建立在此特点之上。在 pH 4.5 缓冲液条件下, 底物的 C 端羧基带负电荷, 而产物 C 端酰胺基团不带电荷, 这样底物相对多一个负电荷, 毛细管电泳中两者可以分开;在碱性条件下, 不带电荷的酰胺基团使得 α -N-acetyl-Tyr-Val-NH₂ 表现强烈的疏水性, 用乙酸乙酯抽提时, 98% 都进入有机相, 而 98% 未反应底物 α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly 则在水相中。将毛细管电泳方法应

用于 C 端酰胺化结构分析, 尚未见其它文献报道, 这方面研究我们将另文发表。

参 考 文 献

- 1 Eipper B A, Stoffers D A, Mains R E *et al.* Ann Rev Neurosci, 1992, **15**:57
- 2 Bradbury A F, Finnie M D, Smyth D G. Nature, 1982, **298**:686
- 3 Eipper B A, Mains R E, Glembofski C C. Proc Natl Acad Sci, 1983, **80**:5144
- 4 Glauder J, Ragg H, Rauch J *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1990, **169**:551
- 5 Eipper B A, Park L P, Dickerson I M *et al.* Mol Endocrinol, 1987, **1**:777
- 6 Stoffers D A, Ouafik L, Eipper B A *et al.* J Biol Chem, 1991, **266**:1701
- 7 Mizuno K, Ohsuye K, Wada Y *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1987, **148**:546
- 8 Ohsuye K, Kitano K, Wada Y *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1988, **150**:1275
- 9 Iida T, Fuse Y, Tajima M *et al.* 1990, 专利号: WO8912096
- 10 Ohsuye K, Kitano K, Tanaka S *et al.* 1990, 专利号: WO9008190
- 11 Tanaka S, Ohsuye K, Magota K *et al.* 1990, 专利号: WO9008194
- 12 Gilligan J P, Jones B N. 1986, 专利号: US4708934
- 13 Bertelsen A H, Gilligan J P, Jones B N *et al.* 1993, 专利号: EP529742
- 14 Matsuo H, Mizuno K, Kojima M *et al.* 1989, 专利号: EP333399
- 15 SAGA, CENG, HODO *et al.* 1987, 专利号: J62205795
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 17 江智红, 杨毅, 屠红旻等, 生物物理和生物化学学报, 1996, **28**(6):606~615
- 18 Yonekura H, Anzai T, Kato I *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1996, **218**:495~499
- 19 Milgram S L, Johnson R C, Mains R E *et al.* J Cell Biol, 1992, **117**:717~728

Functional Expression of Rat Peptidylglycine α -amidating Monooxygenase in CHO Cells and Its Use in *in vitro* Amidation

Jiang Zhihong Yang Yuhong Xu Laigeng Yang Xinying Xia Qichang
Li Boliang Wang Debao

(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract Rat peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM) was functionally expressed in stably transfected CHO cells by using eukaryotic expression plasmid pSVPAM, which was constructed with rPAM gene screened from rat brain cDNA library. The product mainly secreted in the medium is a bifunctional enzyme with the optimal pH value and concentration of copper ion. The kinetics studies of PAM show that the K_m value is $12.5 \mu\text{mol/L}$ and the V_{max} is $180 \mu\text{mol/mg/h}$ in the amidating reaction with α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly. Recombinant bifunctional PAM can be used in amidating process of synthesized polypeptides and proteins expressed by gene engineering.

Key words Amidation, PAM, functional expression, bifunctional enzyme