

聚唾液酸修饰 CuZn-SOD 及其形态和稳定性研究

林怡¹, 吴剑荣¹, 沈轶强², 詹晓北^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 南洋理工大学 材料科学与工程学院, 新加坡 639798)

摘要: 聚唾液酸 (Polysialic acid, PSA) 因其更为有效的安全性, 被公认为传统药用缓释材料——聚乙二醇 (PEG) 的理想替代材料。作者对蛋白质药物——铜锌超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD) 的聚唾液酸修饰进行了初步研究。研究了修饰反应的主要条件: 聚唾液酸经高碘酸钾氧化后生成的活化体, 与超氧化物歧化酶以 40 : 1 的摩尔比反应 24 h, 可以达到理想修饰效果, 生成的聚唾液酸修饰的超氧化物歧化酶衍生物 (PSA-SOD) 平均交联比达到了 3.9 ± 0.3 。该衍生物经过 SDS-PAGE 电泳和原子力显微镜 (AFM) 检测测得其平均相对分子质量为 90 000 ~ 100 000, 分子粒径为 10~15 nm, 约为天然超氧化物歧化酶的 4 倍。除此, PSA-SOD 呈单颗粒包覆和多颗粒包覆两种显微形态。PSA-SOD 进行稳定性试验表明, 经聚唾液酸修饰的超氧化物歧化酶的酸碱稳定性、热稳定性和抗酶解稳定性都有了较大程度的提高。

关键词: 聚唾液酸; 铜锌超氧化物歧化酶; 交联修饰; 酶活稳定性

中图分类号: TQ 920 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)02-211-06

Modification of CuZn-SOD by Polysialic Acids: Synthesis, Characterization and Enzyme Stability

LIN Yi¹, WU Jian-rong¹, SHEN Yi-qiang², ZHAN Xiao-bei^{*1}

(1. Industrial Biotechnological Key Laboratory of Education Ministry, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Nanyang Technological University, School of Materials Science and Engineering, Singapore 639798, Singapore)

Abstract: Polysialic acid (PSA) is considered an ideal alternative material of the polyethylene glycol (PEG) for protein or peptide modification due to its more effective safety in therapeutics. This research was a preliminary study of modification of CuZn superoxide dismutase (CuZn-SOD) with polysialic acid. The optimal conditions for the modifying reaction were as follows: PSA was activated by periodate oxidation, then coupled to CuZn-SOD in the PSA: SOD mole ratios of 40: 1 for 24h. It was shown that polysialylated macromolecule contained 3.9 ± 0.3 molecules of PSA per molecule of SOD. SDS-PAGE electrophoresis and Atomic Force Microscopy (AFM) revealed that the molecular weight of polysialylated SOD was about 90~100kDa and the average size was 10~15nm, about four-fold of native enzyme size. Besides, it showed two kinds of microscopic spherical shape: coated single particle or coated multiple particles. As compared with native enzyme, the stabilities of modified enzyme against heat, acid, alkali and proteinases such as pepsin and trypsin were improved significantly.

Key words: polysialic acids, CuZn-SOD, coupling modification, enzyme stability

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 江南大学自主科研基金项目(2009LYY14)。

* 通信作者: 詹晓北 (1962-), 男, 北京人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化工程与反应器等研究。E-mail: xbzhan@yahoo.com

超氧化物歧化酶(SOD)是一种专一清除氧自由基的金属酶类,可以治疗由氧自由基引起的一系列疾病如:关节炎、类风湿关节炎等综合症等,此外在抗辐射、抗肿瘤和预防衰老等方面也发挥着重要作用^[1]。但是,该酶与其他蛋白质类药物一样,在常温下稳定性差,耐热、耐酸、耐碱能力低,不易保存,摄入机体后易被体内酶降解,并且通常具备较强的免疫原性,极易引起机体免疫反应,导致其在机体内半衰期较短,限制了它在临床上的推广应用。对该酶进行化学修饰是目前解决上述问题的主要方法,所用的修饰材料主要是一些亲水性的大分子如聚乙二醇(PEG)、右旋糖苷、白蛋白、明胶和淀粉等聚合物^[2],其中报道以 PEG 修饰效果最佳,并获得美国 FDA 批准^[3]。

PEG 化(PEGylation)是目前化学修饰蛋白及多肽类药物的主流方法,但目前第二代 PEG 修饰技术用的大分子 PEG 进入机体后无法降解和排出,PEG 本身可能形成新的免疫原,因此尚难评估积累该物质对机体的长期效应。基于这一点,Gregoriadis 等人^[4]提出可使用聚唾液酸代替 PEG 分子来修饰蛋白和肽类药物。Constantinou 等人^[5-6]也通过研究发现,经聚唾液酸修饰后肿瘤抗体稳定性提高,免疫原性降低,有效延长了抗体在机体内的半衰期。聚唾液酸是一种通过微生物发酵制备的 N-乙酰神经氨酸(唾液酸)的多聚分子,具有强亲水性和生物可降解性,与蛋白质具有很好的相容性^[4]。由于唾液酸是动物细胞表面糖蛋白和糖脂的末端寡糖,在细胞之间粘附和信号识别等生物过程中起重要作用,因此含聚唾液酸或者唾液酸的物质进入机体则表现非免疫原性^[4]。

作者首次尝试将通过微生物发酵制备并纯化的聚唾液酸用于修饰铜锌超氧化物歧化酶,并且研究了修饰反应的主要条件。另外,通过酶活稳定性测试,确证了聚唾液酸修饰对铜锌超氧化物歧化酶稳定性的影响,并采用蛋白凝胶电泳和原子力显微镜对修饰酶进行了形态分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 聚唾液酸粗品:作者所在研究室制备^[7-8];铜锌超氧化物歧化酶:浙江康基生物公司提供。

1.1.2 试剂 蛋白质相对分子质量标准品:购自上海生工。唾液酸标准品(N-乙酰神经氨酸)和 NaCNBH₃;Sigma 公司产品;胃蛋白酶(Pepsin):购自上海聚源生物公司产品;胰蛋白酶(Trypsin):国药试剂公司产品。

1.2 方法

1.2.1 聚唾液酸含量测定 采用间苯二酚法^[9]。

1.2.2 聚唾液酸的分离纯化 发酵液经乙醇沉淀,氯代十六烷基吡啶(CPC)络合和解离后,透析(透析膜截留相对分子质量为 7 000)24 h,冷冻干燥后保藏备用。聚唾液酸产品重新溶解,上 DEAE Fast Flow(GE,美国)凝胶层析柱,收集聚唾液酸洗脱峰,透析脱盐,冻干即得聚唾液酸纯品,-20 °C 保存^[10-11]。

1.2.3 聚唾液酸平均相对分子质量及纯度的鉴定

采用高效液相凝胶过滤色谱法(HPGFC),色谱条件:色谱柱 Ultrahydrogel™ Linear 300 mm×7.8 mm×2 mm;示差检测器,流动相 0.1 mol/L NaNO₃,流量 0.9 mL/min;柱温 45 °C。

1.2.4 蛋白质含量测定 考马斯亮蓝法^[12]。

1.2.5 内毒素测定 凝胶法^[13]。

1.2.6 聚唾液酸的激活^[14] 聚唾液酸纯品在高碘酸钠的作用下,非还原末端 C-7 上的邻二醇结构被氧化为活性醛基。将 100 mg 纯化的聚唾液酸与 10 mL 0.1 mol/L 高碘酸钠混合,在 20 °C 水浴避光振荡 15 min。再加入 20 mL 乙二醇终止反应,继续振荡 30 min,反应液质量分数在 0.02% (NH₄)₂CO₃ 溶液中透析(截留相对分子质量为 7 000)24 h。

1.2.7 聚唾液酸对 SOD 的修饰^[14] 活化聚唾液酸与 CuZn-SOD 表面的自由氨基在 NaCNBH₃ 的作用下,发生希夫碱反应生成 PSA-SOD 交联体。将 SOD(1 mg/mL)溶于磷酸缓冲液(pH 7.2),加入活化的聚唾液酸(过量)和 NaCNBH₃(5 mg/mL),置于密封管中在 25 °C 下振荡 24 h。将反应液用分子筛层析分离去除未反应的试剂,收集修饰酶冻干保存。

1.2.8 聚唾液酸修饰 SOD 交联比的测定^[9] 将上述反应液用三氯乙酸(TCA)进行蛋白沉淀(游离聚唾液酸在 TCA 条件下不沉淀,交联聚唾液酸随着交联蛋白一块沉淀),然后测定上清液中游离聚唾液酸的含量。用差量法计算交联聚唾液酸的含量与 SOD 总量摩尔之比(交联比),即平均每个 SOD

分子交联上的聚唾液酸分子数。实验操作:定时取 100 μ L 反应液,加入 TCA 至 10 g/dL,4 $^{\circ}$ C 下静置 30 min,使酶充分沉淀,3 000 g 离心 30 min,取上清液测定游离聚唾液酸含量。

1.2.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

电泳浓缩胶质量浓度 4.5 g/dL,分离胶质量浓度 12 g/dL,以蛋白 Marker 为对照,测得经聚唾液酸修饰 SOD 的相对分子质量。

1.2.10 原子力显微镜(AFM)

样品用 Dimension 3100(Veeco,加拿大)在轻敲模式下拍摄,探针选择为硅,共振频率 320 kHz,弹簧常数 42 N/m。扫描频率 1 Hz,扫描行数 512。

1.2.11 CuZn-SOD 活测定

参照 CuZn-SOD 试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所提供)。

$$\text{酶活保留率}(\%) = \frac{\text{修饰后 SOD 活力}}{\text{修饰前 SOD 活力}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 聚唾液酸的纯化及相对分子质量的测定

聚唾液酸粗品经多步分离除杂后,去除了大部分蛋白,再经 DEAE 柱层析,收集含聚唾液酸的洗脱峰,检测纯度为 99.7%。收集峰经茚试剂测定,内毒素去除率大于 99.8%;经考马斯亮蓝法测定低于蛋白质检出限(1 μ g/mL),表明 DEAE 柱可很好地去除杂蛋白质和大部分内毒素。聚唾液酸样品通过 HPGFC 分析,其平均相对分子质量为 16 200,分布宽度为 1.425。

2.2 聚唾液酸对 CuZn-SOD 的修饰

将 PSA 与 CuZn-SOD 分别按 20 : 1,40 : 1,60 : 1 和 100 : 1 的摩尔比混合进行交联反应。结果如图 1 所示,该交联反应最初是个快速反应,8 h 后反应趋缓,约 12 h 后,交联反应趋于平衡,交联比达到一个稳定值。不同 PSA : SOD 反应条件下,测得平均每个 SOD 交联 1.8~4.8 个聚唾液酸。随着反应体系中 PSA : SOD 从 20 : 1 增加到 40 : 1,交联比增长明显,PSA : SOD 继续增加,交联比则增长缓慢。这可能是聚唾液酸的强电负性造成的电荷竞争和分子空间位阻共同影响形成的结果。从实验效果出发,选用 PSA : SOD 摩尔比 40 : 1,反应时间为 24 h 即可满足要求。在该条件下,制得的修饰酶的平均交联比为 3.9 \pm 0.3,由聚唾液酸相对分子质量(16 200)和 CuZn-SOD 相对分子质量

(32 000)计算得到修饰酶的平均相对分子质量为 95 000 \pm 4 900。

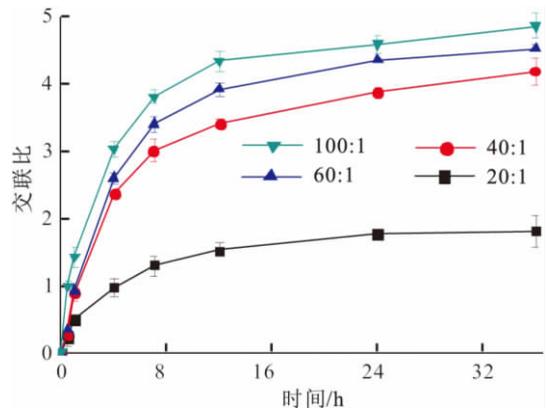
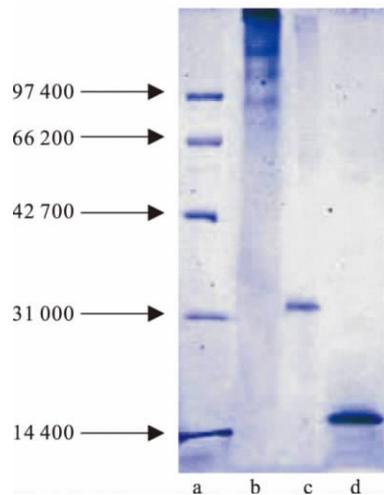


图 1 PSA 修饰 CuZn-SOD 的交联比曲线
Fig. 1 Crosslinking ratio curve for PSA-SOD

2.3 修饰酶的形态分析

2.3.1 天然酶和修饰酶的 SDS-PAGE 分析

CuZn-SOD 修饰前后的 SDS-PAGE 结果如图 2 所示,天然酶的相对分子质量约为 32 000,打开二硫键后的天然酶亚基相对分子质量约为 16 000,这与 Zelko 等人^[15]的报道结果一致。经聚唾液酸修饰后的 SOD 相对分子质量明显增大,使其在凝胶电泳中的迁移速率大大减慢。如图 2 中 b 条带所示,修饰酶相对分子质量约为 90 000~100 000,这与上文交联比测得的平均相对分子质量(95 000 \pm 4 900)相符,表明修饰的 SOD 的水合能力大大增强。



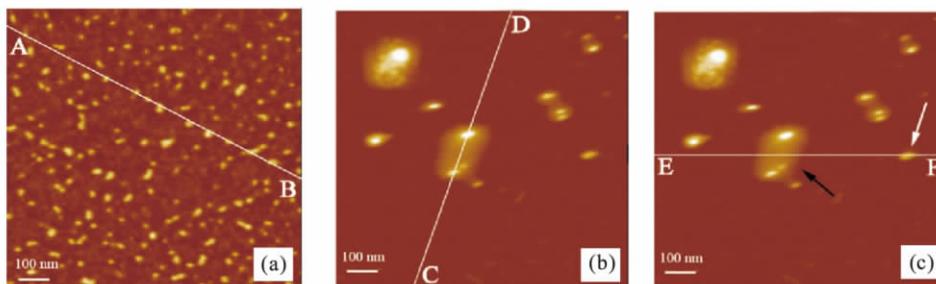
a: 蛋白 Marker; b: 修饰酶; c: 天然酶; d: 天然酶亚基

图 2 天然酶与修饰酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of native enzyme and modified enzyme

2.3.2 天然酶和修饰酶显微形态分析 AFM 可以得到纳米级的、清晰的生物样品三维结构图像, 测算出分子的宽度和高度。图 3(a)、(b)和(c)分别为 SOD 修饰前后的 AFM 图像, 观测范围均为 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ 。修饰前天然酶呈均匀的小颗粒, 分子粒径约为 $2.5 \sim 3.5\ \text{nm}$ 。经聚唾液酸修饰后的 SOD 表面有一层云状包覆, 平均分子粒径增加为 $10 \sim 15\ \text{nm}$, 约为修饰前酶分子粒径的 4 倍。修饰酶有两种形态, 一种是单颗粒包覆形态(图 3 c 中白箭头), 另一种是多颗粒包覆形态(图 3 c 中黑箭

头)。分析是修饰位点数量和电荷排斥等原因共同造成的: SOD 表面有多个可修饰 $\epsilon\text{-NH}_2$ 位点^[17], 由包覆形态推测进行的是多点修饰。聚唾液酸本身带强负电性^[4], 由于修饰聚唾液酸相互间的电荷排斥作用, 使修饰酶呈现单个 SOD 被多个聚唾液酸包覆的形态; 当酶分子距离较近时, 活化聚唾液酸不仅能修饰酶分子, 还能发生自聚合而使多个修饰体连接, 所以呈现多颗粒包覆形态。另外, 图 3(b)和(c)显示修饰酶横向宽度差异较大, 分析是云母基底表面酶分子的取向不同所造成的。



(a)天然酶的 AFM 图; (b)修饰酶的 AFM 图; (c)修饰酶的 AFM 图, 白箭头指向单颗粒包覆形态, 黑箭头指向多颗粒包覆形态

图 3 天然酶与修饰酶的 AFM 图谱

Fig. 3 AFM image of native enzyme and modified enzyme

2.4 修饰酶的稳定性研究

2.4.1 修饰酶的酸碱稳定性 取等量天然酶和修饰酶, 溶于 2 mL pH 缓冲液中, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴保温, 定时测定酶活力, 结果如图 4 所示。

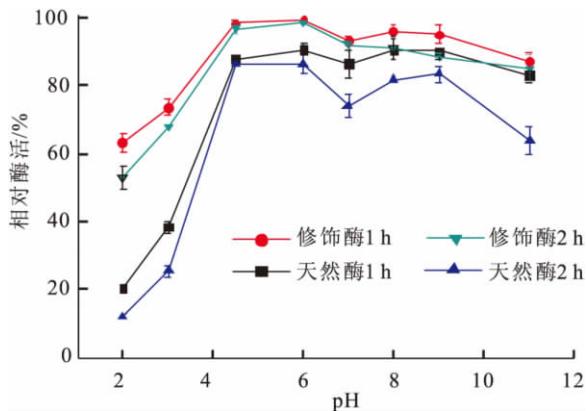


图 4 修饰酶的酸碱稳定性

Fig. 4 Stability of modified enzyme at different pH

在测试的 pH 2~11 范围内, 修饰酶的相对活力均高于天然酶, 尤其在强酸性(pH 2~3)和强碱性(pH 11)环境下, 抗酸碱稳定性显著提高。在 pH 2~3 的酸性条件下, 1h 后修饰酶酶活保留率为 $64\% \sim 74\%$, 而天然酶活力保留率急剧下降, 仅为

$20\% \sim 38\%$ 。2 h 后, 差异更加明显, 天然酶活力保留率仅剩 $10\% \sim 25\%$, 而修饰酶酶活保留率仍有 $53\% \sim 68\%$ 。在 pH 11 碱性条件下, 处理 2 h 后修饰酶活力保留率约为 85% , 也比天然酶高出近 11%。聚唾液酸修饰明显改善了 SOD 在酸性条件下的稳定性, 对于 SOD 人体服用具有重要意义。

2.4.2 修饰酶的热稳定性 将等量天然酶和修饰酶溶于 PBS(pH 7.4)中, 于 $70\ ^\circ\text{C}$ 和 $80\ ^\circ\text{C}$ 水浴保温, 定时取样测定 SOD 活, 结果如图 5 所示。

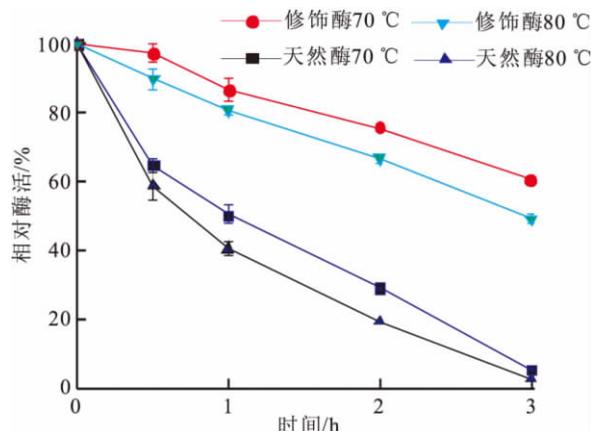


图 5 修饰酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of modified enzyme

在 70 °C 条件下,处理时间内修饰酶比天然酶高出 35%~55%。在更高的 80 °C 条件下,修饰 SOD 也比天然酶高出 31%~45%。在高温下天然酶酶活快速降低,当反应到 3 h 时,天然酶已几乎失活,相比修饰酶仍有 49%~61% 的剩余酶活,聚唾液酸修饰显著地提高了 SOD 的热稳定性。

2.4.3 修饰酶的抗酶解稳定性 将等量天然酶和修饰酶分别加入人工胃液(胃蛋白酶,pH 5.0,以排除强酸影响)和人工肠液中(胰蛋白酶,pH 6.8),于 37 °C 保温,定时取样测定 SOD 活,结果如图 6 所示。

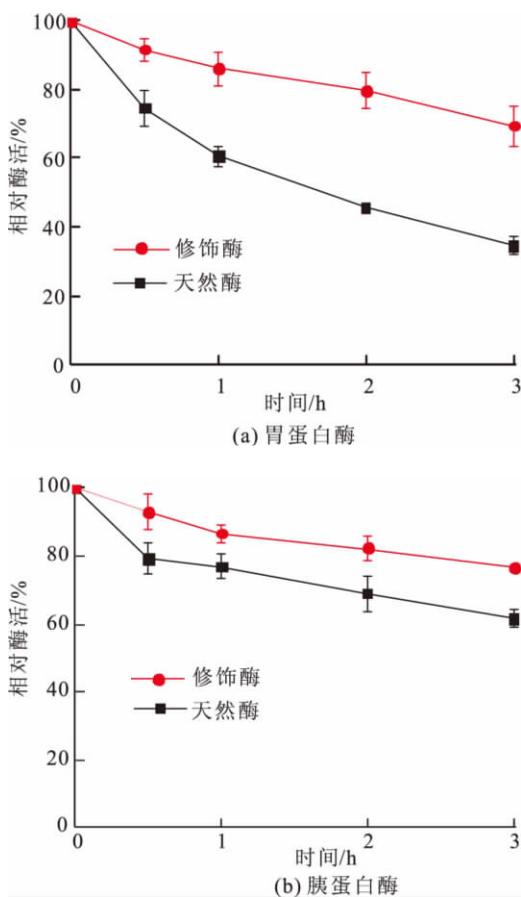


图 6 修饰酶抗酶解稳定性
Fig.6 Resistance of modified enzyme

在人工胃液中,修饰酶的酶活保留率比天然酶高出 20%~35%。在人工肠液中,修饰酶比天然酶酶活保留率高出近 15%。随着反应时间的增加,修饰酶逐渐显示出比天然酶更佳的抗酶解稳定性。PEG 对酶进行修饰时,酶的稳定性有明显提高。Veronese 等^[18]推测 PEG 与蛋白质分子结合后,由于修饰程度较高,其 PEG 长链在溶液中可在蛋白质周围自由移动,对蛋白质起到保护作用,使蛋白质的稳定性提高。相比聚唾液酸修饰 SOD 的修饰程度低于 PEG,修饰酶的抗热、抗酸碱和抗酶解方面稳定性得到了有效的增强,分析推测是以下 3 个原因:(1)聚唾液酸具有高度亲水性,使得修饰酶分子表面的酶解位点被聚唾液酸所掩蔽,形成了一个多糖水化保护层;(2)聚唾液酸具有强负离子性,它与相邻的带相反电荷的氨基酸残基相互作用,形成了第二层保护层;(3)推测修饰酶的四级构象有所变化,使分子表面暴露的酶解位点移位至分子内部而被掩盖,从而增强了其稳定性。

3 结 语

采用相对分子质量为 16 200 的高纯度聚唾液酸对 CuZn-SOD 进行修饰,当聚唾液酸与超氧化物歧化酶以 40 : 1 的摩尔比反应 24 h,可以达到理想修饰效果。在此条件下生成的 PSA-SOD 衍生物的平均交联比达到了 3.9±0.3。该衍生物经过 SDS-PAGE 电泳检测测得其平均相对分子质量增大为 90 000~100 000。并首次用原子力显微镜观察到修饰酶分子粒径 10~15 nm,约为修饰前的 4 倍,修饰酶的表面有一层云状包覆,呈单颗粒包覆和多颗粒包覆两种显微形态,分析推测进行的是多点修饰。与天然 SOD 相比,PSA-SOD 衍生物在酸碱稳定性、热稳定性和抗酶解稳定性方面都有显著提高,修饰效果与相关文献报道中 PEG 修饰的效果类似^[19,20]。

参考文献(References):

[1] Menander-Huber, Huber K B, Orgotein W. The Drug Version of Bovine Cu, Zn Superoxide Dismutase, II. A Summary of Clinical Trial in Man and Animals [M]. London:Academic Press, 1977.

[2] Muzykantov V R. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium [J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 71(1): 1-21.

[3] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P, et al. Pharmacokinetic consequences of pegylation [J]. *Drug Delivery*, 2006, 13(6): 399-

409.

- [4] Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids [J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2005, 300(1-2): 125-130.
- [5] Constantinou A, Epenetos A A, Hreczuk-Hirst D, et al. Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment [J]. **Bioconjugate Chemistry**, 2009, 20(5): 924-931.
- [6] Constantinou A, Epenetos A A, Hreczuk-Hirst D, et al. Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation [J]. **Bioconjugate Chemistry**, 2008, 19(3): 643-650.
- [7] 詹晓北, 于军华, 吴剑荣, 等. NTG 对 *E. coli* 突变株聚唾液酸产量的影响 [J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 456-459.
ZHAN Xiao-bei, YU Jun-hua, WU Jian-rong, et al. Screening of polysialic acid yield of *E. coli* by NTG mutagenesis [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2002, 21(5): 456-459. (in Chinese)
- [8] 詹晓北, 郑志永, 贾薇, 等. 大肠杆菌⁶⁰Co 诱变育种及其发酵生产聚唾液酸条件 [J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(4): 315-318.
ZHAN Xiao-bei, ZHENG Zhi-yong, JIA Wei, et al. The Breeding of *Escherichia coli* by ⁶⁰Co mutagenesis and conditions for the production of polysialic acid [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2000, 19(4): 315-318. (in Chinese)
- [9] Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids [J]. **Biochemical et Biophysical Acta**, 1957, 24: 604-611.
- [10] 郁丹凤. 聚唾液酸和唾液酸提取工艺的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [11] 郑志永, 詹晓北, 吴剑荣, 等. 大肠杆菌产生的聚唾液酸的结构 [J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 38-41.
ZHENG Zhi-yong, ZHAN Xiao-bei, WU Jian-rong, et al. Structure analysis of polysialic acid in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2005, 24(5): 38-41. (in Chinese)
- [12] Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250 [J]. **Analytical Biochemistry**, 2005, 79: 544-552.
Zhan X B, Zheng Z Y, Jia W, et al. The breeding of *Escherichia coli* ⁶⁰Co mutagenesis strains and the conditions on the production of polysialic acid [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2000, 19(4): 315-318. (in Chinese)
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] Jennings H J, Lugowski C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates [J]. **The Journal of Immunology**, 1981, 127: 1011-1018.
- [15] Zelko I N, Mariani T J, Folz R J et al. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression [J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2002, 33(3): 337-349.
- [16] Zhu J, Sun R G. Applications of atomic force microscopy to the structures and functions of single protein molecule (in Chinese) [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2006, 34(5): 735-740.
- [17] 林大威, 袁勤生. Cu, Zn-SOD 的分子绘图、分子表面可及性及分子表面静电势的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 1991, (01): 19-20.
LIN Da-wei, YUAN Qin-sheng. The study of the molecular graphics, molecular surface accessibility and molecular surface electrostatic potential of Cu, Zn-SOD [J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 1991, (01): 19-20. (in Chinese)
- [18] Veronese F M, Sartore L, Schiavonand O et al. A comparative study of enzymatic, structural, and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase isolated from two sources and modified by monomethoxypolyethylene glycol using different methods of coupling [J]. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1990, 613: 468-473.
- [19] 尹亮, 赵树进. 聚乙二醇修饰超氧化物歧化酶稳定性变化的研究 [J]. 生物技术, 2003, 13(4): 29-30.
YIN Liang, ZHAO Shu-jin. Polyethylene glycol modified superoxide dismutase and study on its stability [J]. **Biotechnology**, 2003, 13(4): 29-30. (in Chinese)
- [20] 孔庆胜, 连玉官. 聚乙二醇修饰超氧化物歧化酶的基础研究 [J]. 济宁医学院学报, 2006, 29(1): 16-17.
KONG Qin-sheng, ZHANG Yu-gong. Study on Polyethylene glycol modified superoxide dismutase [J]. **Journal of Jining Medical College**, 2006, 29(1): 16-17. (in Chinese)