

一种催化甲状腺素脱碘的抗体酶

廉革伟¹, 陈默¹, 刘仔², 丁兰¹, 赵大庆^{1*}, 倪嘉缙¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所稀土化学与物理开放实验室, 吉林 长春 130022;

2. 长春解放军农牧大学军事兽医研究所, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的 模拟生物体内一族重要的含硒酶-甲状腺素脱碘酶, 制备催化甲状腺素脱碘的含硒抗体酶。方法用杂交瘤技术制备出抗甲状腺素的单克隆抗体 4C5, 再用化学修饰法将催化基团硒代半胱氨酸引入到抗体的抗原结合部位, 得到含硒抗体酶 Se-4C5; 通过 RIA 方法测定抗体酶活力。结果 抗体酶 Se-4C5 有明显的催化甲状腺素脱碘活性, 其 V_{max} 为 $270 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (protein); 催化反应速率与底物浓度的双倒数图为一组平行线; 对底物甲状腺素的特异性高于天然酶; 6-丙基-2-硫代尿嘧啶对其活力起抑制作用, 是二硫苏糖醇 (DTT) 的竞争性抑制剂。结论 首次制备出有天然脱碘酶活性的抗体酶, 催化机制属于双底物乒乓反应机制。

关键词: 硒; 甲状腺素; 脱碘酶; 抗体酶; 化学修饰

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)07-0514-05

3, 5, 3', 5'-四碘甲状腺原氨酸又称甲状腺素 (T_4)。在人和动物体中, 它对机体的生长发育、基础代谢与脑和器官的形成发挥重要调节功能, 这主要通过其降解产物 3, 5, 3'-三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 和受体的相互作用来完成^[2-3]。生物体内的 T_3 主要由 T_4 在脱碘酶催化下脱碘产生, 其生物活性是 T_4 的 5-8 倍^[4]。自 70 年代以来, 生物体内已发现有 3 种脱碘酶 (I, II 和 III 型)^[5-7], 它们分别催化甲状腺素的不同降解反应, 共同协调甲状腺素的生理功能^[5]。其中, 对 I 型脱碘酶的酶学性质、催化机制、空间结构和生理功能等进行了系统研究, 证实它作为一种分子量 27 ku 的含硒酶^[8], 含有一个硒代半胱氨酸催化基团, 能催化 T_4 降解为 T_3 和 rT_3 。研究表明, 若将硒代半胱氨酸突变为其它氨基酸, 则酶的活性几乎全部丢失。近几年, 其基因克隆和表达已有诸多报道^[5, 8], 但此酶稳定性差, 来源有限, 基因表达量低和分离纯化困难, 因此, 现在对其生化性质、结构和应用研究一直很难取得进展。

为了阐明脱碘酶的脱碘机理和硒代半胱氨酸的

作用, 一些研究者^[9]用含硒小分子化合物对脱碘酶进行了模拟研究, 并得到了有意义的结果。但小分子化合物无天然酶的蛋白部分, 无法得到具有活性的构象, 因此不能象天然酶那样有高的活性。抗体酶的出现, 为解决天然酶不足和模拟研究提供了新的途径和方法。自 1986 年 Lerner 等分别制备了具有催化作用的抗体酶以来, 抗体酶研究已得到迅猛的发展。目前已制备了能催化几十种不同反应的抗体酶^[10], 有些达到或超过了天然酶的活力^[11]。为了探讨脱碘酶的催化机制和解决脱碘酶的不足, 本文以脱碘酶的结构和初步催化机制为基础, 采用单克隆抗体技术和化学修饰法制备了一种新的具有脱碘作用的抗体酶, 并对其动力学性质进行了研究。此研究为脱碘酶的人工模拟和治疗甲状腺疾病有关的药物开发奠定了基础。

材 料 和 方 法

材料 3, 5, 3', 5'-四碘甲状腺原氨酸五水钠盐 (T_4), 3, 5, 3'-三碘甲状腺原氨酸钠盐 (T_3), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 二硫苏糖醇 (DTT), 6-丙基-2-硫代尿嘧啶 (PTU), 牛血清白蛋白 (BSA), 卵清白蛋白 (Ovalbumin) 和兔抗鼠亚型抗体检测试剂盒购自 SIGMA 公司; HAT (Hypoxanthine aminopterin and thymidine) 溶液和 IMDM 培养液购自 GIBCOBRL 公司, 新生胎牛血清系大连生物试剂厂产品, Balb/c 小

收稿日期: 2000-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金 (29701005); 中国科学院基础局重大项目基金 (KJ951-AI-504-02); 国家杰出青年科学基金 (29625203) 资助项目。

作者简介: 廉革伟 (1970-), 男, 博士研究生;

赵大庆 (1963-), 男, 研究员, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (0431) 5262038, E-mail: dqzhaoh@ciac.jl.cn

鼠由长春生物制品研究所提供,小鼠骨髓瘤细胞系 Sp/20 由长春解放军农业畜牧大学提供,HRP 羊抗鼠 IgG 抗体购自华美公司,游离三碘甲状腺素放射免疫检测试剂盒由白求恩医科大学医院提供,完全和不完全佛氏佐剂自制,G10,G25,SDS-聚丙烯酰胺凝胶和蛋白 A 亲和柱购自 Pharmacia 公司,聚乙二醇 4000 系 Merck 产品,细胞培养板购自 Nunc 公司。其他试剂均为分析纯。

抗原的制备、纯化和半抗原连接量的测定 3, 5, 3', 5'-四碘甲状腺原氨酸五水钠盐(T_4) 5.0 mg 室温搅拌下溶解于乙醇-碳酸钠缓冲液的混合液(1:2) 1.0 mL 中,向此溶液中慢慢加入含有 5.0 mg 牛血清白蛋白或卵清白蛋白溶液 1.0 mL。30 min 内加入 0.02% 的戊二醛溶液 200 μ L,搅拌过夜。反应混合物经透析,通过 G25 色谱柱,冻干,即得全抗原。其中甲状腺素-牛血清白蛋白全抗原用于免疫,甲状腺素-卵清白蛋白全抗原用于 ELISA 检测。 T_4 在碱性溶液中于 325 nm 有最大吸收峰,因此通过测定全抗原在 325 nm 和 280 nm 的紫外光吸收值,可求出每个全抗原中半抗原的连接量。

抗甲状腺素单克隆抗体细胞株的制备 选取 5 只 6 - 8 周龄健康 Balb/c η 小鼠,尾部取血作空白对照。用甲状腺素-牛血清白蛋白抗原进行免疫。第 1 次向小鼠 ip 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗原 0.2 mL 与等体积完全佛氏佐剂的乳化剂,以后每两周用不完全佐剂与 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗原的等体积乳化剂对小鼠加强免疫一次。第 4 次用不含佐剂的 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原溶液 100 μ L 经 iv 免疫, d 3, 取小鼠脾脏细胞与 SP/20 骨髓瘤细胞进行融合。d 10 对肉眼可见克隆的上清进行 ELISA 抗体检测。经检测为阳性者,通过有限稀释法进行再克隆。经 3 轮筛选与克隆化培养,最后达到 100% 抗体阳性率,从而获得产生单抗的细胞株。

腹水的制备和纯化 取 10 只健康的 Balb/c 小鼠, ip 0.5 mL 降植烷。d 7 后向小鼠 ip 单克隆细胞株系 4C5 的培养细胞,约 1 - 2 周小鼠腹腔中有腹水产生,收集腹水,10 000 g 离心 20 min,上清用生理盐水缓冲液(PBS)稀释一倍,不断搅拌下慢慢加入等体积饱和硫酸铵溶液(pH 7.0)。4 $^{\circ}\text{C}$ 静止过夜,10 000 g 离心 20 min,弃上清,加入 1/2 原体积的 40% 硫酸铵溶液,10 000 g 再次离心 20 min。将沉淀溶于 1/4 原体积的 PBS(pH 7.2)中,用截留分子量为 10 000 的透析袋透析 24 h 后,将抗体溶液通过 HiTrap Protein A 柱,用甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 3.0)

洗脱,收集蛋白峰,透析冻干,即得纯品。

抗体性质测定 抗体纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 MALDI-TOF-MS 测定。解离常数用竞争性 ELISA 法测定^[12]。蛋白质含量测定用 Lowery 法^[13]。用兔抗鼠的抗各种亚型检测试剂盒测定抗体亚型。

硒化钠的制备 硒化钠按 Klayman 法制备^[14]。

含硒催化抗体的制备及硒含量测定 按 Bell I M 等^[15]方法制备含硒抗体酶。将单克隆抗体可变区的丝氨酸的羟基经 PMSF 活化,再与 NaHSe 反应,则可将丝氨酸转变为硒代半胱氨酸(Se-Cys)。

10 μ g 单克隆抗体 4C5 溶于 PBS 1.0 mL 中,加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲磺酰氟的乙酐溶液 20 μ L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h,通过 G25 凝胶色谱柱,收集蛋白峰,浓缩至 1.0 mL,加入等体积的 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHSe 溶液, N_2 保护下,40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 36 h,用 HCl 将 pH 值调至 7.0,通过 G25 凝胶色谱柱,收集蛋白峰,冻干保存。用 DTNB 法测定硒含量^[16]。先用 NaBH_4 将抗体中的硒和二硫键还原成硒氢基和巯基,再与 DTNB 反应生成红色化合物,比较硒化前后抗体生成的红色化合物在 410 nm 的吸光度值,可得出抗体中的硒含量。

催化脱碘作用和 T_3 含量测定 含 5 - 20 μ g 硒化抗体的溶液加到不同浓度 DTT 的溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,再加入不同浓度的甲状腺素溶液(图 4),用 PBS 将体积调至 1.0 mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 - 30 min,取 200 μ L 加入 95% 的乙醇 400 μ L 中,3 000 g 离心 20 min,取上清 100 μ L,用 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)稀释 10 倍后用放射免疫法测定 T_3 含量。以磷酸缓冲液代替硒化抗体溶液在相同条件下做对照实验。

结 果

1 抗原和单克隆抗体性质

戊二醛作偶联剂,甲状腺素与牛血清白蛋白(BSA)(或卵清白蛋白)反应制得全抗原(T_4 -BSA or T_4 -ovalbumin), T_4 -BSA 经 Sephadex G25 柱色谱得到较纯的全抗原(图 1);用吸收光谱法测得它们每个分子中各自含有 24 个和 17 个半抗原。本文用杂交瘤技术得到了 2 株稳定分泌抗甲状腺素单抗的杂交瘤细胞 2E7 和 4C5。经 ELISA 检测,证明杂交瘤细胞 4C5 的腹水效价较高,因此选单抗 4C5 作为硒化

时的抗体。腹水经多步纯化,最后通过对小鼠 IgG 抗体有特异结合性的蛋白 A 亲和柱色谱,洗脱后只得到单一色谱峰(图 2);用兔抗鼠的抗各种亚型的抗体鉴定,单抗 4C5 为 IgG1 型;SDS-PAGE 电泳测得单抗 4C5 分子的轻链和重链分子量分别为 2.5 ku 和 5.2 ku,4C5 的总分子量为 154 ku;用 MALDI-TOF-MS 方法测定 4C5 的总分子量为 154 473.5 u,说明抗体纯度已很高。用竞争性 ELISA 测定其解离常数为 5.4×10^{-8} ,与三碘甲状腺素的交叉反应 $< 0.5\%$ 。

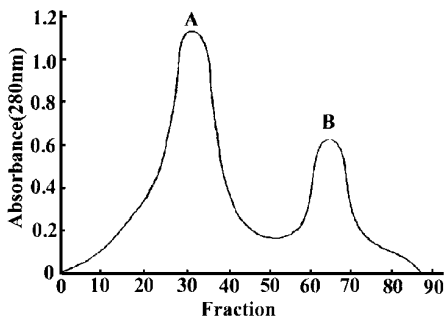


Figure 1 Purification of antigen BSA-T₄ on Sephadex G-25 column. The column was equilibrated and eluted with 50 mmol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0). A: antigen BSA-T₄; B: impurity

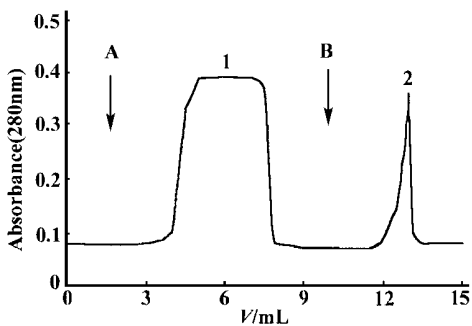


Figure 2 Purification of monoclonal antibody 4C5 by rProtein A affinity column. The column was equilibrated with (A) 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/0.1 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.0 and eluted with (B) 0.1 mol·L⁻¹ citrate buffer (pH 3.0). 1: impurity; 2: monoclonal antibody 4C5

2 将单克隆抗体 4C5 经硒化后制成含硒抗体酶 Se-4C5

单克隆抗体 4C5 的硒化反应过程为:

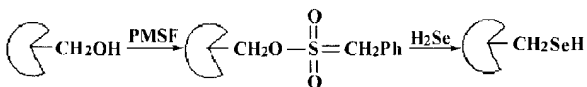


Figure 3 Chemical modification of Ser on antibody into SeCys using PMSF and NaHSe

苯甲磺酰氟在室温下能与抗体可变区的丝氨酸

羟基反应生成苯甲磺酰丝氨酸酯。它再与 NaHSe 反应,苯甲磺酰基被取代生成硒代半胱氨酸。硒氢基和巯基都能与 DTNB 反应生成红色化合物,因此,测定生成的红色化合物在 410 nm 的吸光度可求得抗体中硒含量为每摩尔抗体平均含两摩尔硒。经硒化后酶活测定,含硒抗体酶 Se-4C5 的最大酶活力为 $270 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (protein)。

3 抗体酶 Se-4C5 的催化反应动力学

本文用不同浓度 DTT 对 Se-4C5 催化的甲状腺素(T₄)脱碘作用进行了研究。结果表明,不同 DTT 浓度下,脱碘速率对甲状腺素浓度作双倒数图,得一组平行线(图 4 左)。同样在不同 T₄ 浓度下,Se-4C5 的催化速率对 DTT 浓度作双倒数图,也得相同结果。在图 4 中,将平行线在 y 轴的截距对 DTT 浓度的倒数再作图,得到一条直线(图 4 右),其在 y 轴截距的倒数即为 V_m 值,在 x 轴截距的负倒数即为 K_m (DTT) 值,同样得出 K_m (T₄) 的值。将其与文献^[1]报道的肾脏匀浆液的自然脱碘酶动力学常数列于表 1。由表 1 可见,含天然脱碘酶的肾脏匀浆液的 K_m (T₄) 比催化抗体的高 6 倍多,而催化抗体 Se-4C5 的 K_m (DTT) 和 V_m 分别比含脱碘酶的肾脏匀浆液的高 3.6 和 8 倍。从图 4 可知,Se-4C5 催化的甲状腺素脱碘反应与天然脱碘酶一样是双底物乒乓型反应。

Table 1 Michaelis constants and maximum velocity values for Se-4C5 and rat kidney homogenate

Group	K _m (T ₄) / μmol·L ⁻¹	K _m (DTT) / mmol·L ⁻¹	V _m / pmol (T ₃ formation)·min ⁻¹ ·mg (protein) ⁻¹
Se-4C5	0.8	1.8	270
Rat kidney homogenate ¹	5.0	0.5	36

¹ Containing type I deiodinase

4 6-丙基-2-硫代尿嘧啶 (PTU) 对 Se-4C5 的催化抑制作用

PTU 对天然脱碘酶有强烈抑制作用^[17]。为了研究 PTU 对 Se-4C5 的抑制作用,我们在不同 PTU 浓度下将 Se-4C5 与 2.0 μmol·L⁻¹ T₄ 和不同浓度 DTT 反应。生成 T₃ 的速率对 DTT 浓度做双倒数图,得到一组相交于 Y 轴一点的直线(图 5),可见 Se-4C5 的催化活力随 PTU 浓度增加而下降,PTU 呈现较强的抑制作用;随 DTT 浓度的增加 PTU 抑制作用逐渐减弱,说明 PTU 是 DTT 的竞争性抑制剂。即 Se-4C5 的中间氧化态可能与 PTU 形成了稳定复合物,造成酶活力下降。

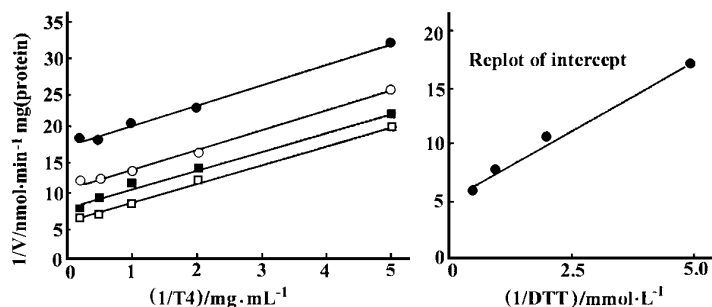


Figure 4 Double-reciprocal plots of deiodination rate versus T_4 concentration at varying DTT concentration. Portions of Se-4C5 solution ($20 \mu\text{g}$ protein) were incubated in duplicate with variable concentration of thyroxine as indicated at several fixed concentration of DTT: $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\bullet), $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\circ), $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\blacksquare) and $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\square). After incubation for 10 min at 37°C , the reactions were stopped and T_3 generated was extracted, diluted and measured as described in the experimental section. The intercept replot was linear giving a V_m of $270 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg}(\text{protein})$. The rate of T_3 formation is expressed as $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg}(\text{protein})$

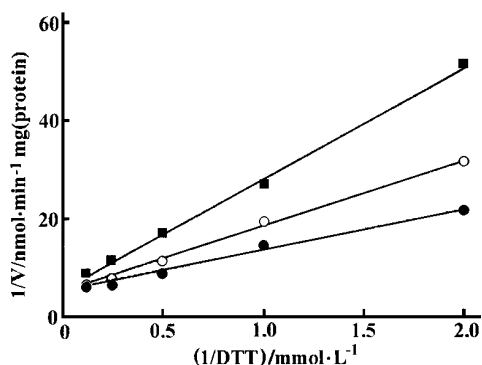


Figure 5 Kinetics of inhibition of T_4 deiodination by PTU. Portions of the solution of $20 \mu\text{g}$ Se-4C5 were in duplicate incubated with thyroxine at $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and variable amounts of DTT as indicated at several concentration of PTU as following: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\bullet), $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\circ) and $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\blacksquare). The following protocol was as as described in the Experimental section

讨 论

小分子模拟物在有机溶剂中高温回流能使甲状腺素发生脱碘作用,生成 T_3 和 rT_3 等,但其缺陷是:由于没有天然酶那样的活性构象,不能有效降低反应的活化能,因此催化温度高、效率低。抗体酶 Se-4C5 克服了小分子模拟物的缺陷,用抗体方法既模拟了天然酶的蛋白部分,又用化学修饰法组装了活性基团硒,从而起到了模拟天然酶特异结合底物,降低反应活化能的特点,并发挥了催化基团硒代半胱氨酸(SeCys)的催化功能。与小分子模拟物相比,具有反应条件温和、催化活力高的特点。另外,含硒抗体酶是一种硒蛋白,含硒量低,因此没有含硒小分子

那样的毒性。但鼠源抗体酶应用于临床治疗与甲状腺素有关的疾病,易引起机体的抗原抗体反应,因此,还需进行抗体酶的人源化工作,制备无免疫原性的人源脱碘抗体酶。

抗体酶 Se-4C5 的动力学研究显示,它催化的反应速率与底物浓度的关系遵从乒乓反应速度方程 $V_{\text{max}}/V = K_{\text{mA}}/[A] + K_{\text{mB}}/[B] + 1$ 。不同 DTT 浓度下反应速率与甲状腺素浓度的双倒数图是一组平行线。PTU 作为 DTT 的竞争性抑制剂,随浓度的增加,其抑制作用逐渐增强。由其动力学和含硒小分子模拟研究结果推断,抗体酶 Se-4C5 的催化机制可能是:甲状腺素(T_4)首先和抗体酶 Se-4C5 结合,在结合部位催化基团(如氨基,羧基或咪唑基等)参与下外环的酚式结构转化成酮式结构,使碳-碘键活化,再与催化基团硒代半胱氨酸(SeCys)反应脱去 $5'$ 位的碘生成 T_3 ,同时抗体酶 Se-4C5 被氧化成酶碘复合物($E\text{-SeI}$)。此复合物再与 DTT 反应,将抗体酶还原,同时生成 I^- 。抑制反应中,PTU 可能与中间态的复合物($E\text{-SeI}$)反应生成一种不可逆产物($E\text{-Se-PTU}$),使抗体酶 Se-4C5 不能恢复还原态,导致了酶活力的下降。

甲状腺素具有多种脱碘降解路线,能够生成 T_3 和 rT_3 ,也可进一步降解为 T_2 等。本文只对抗体酶催化 T_4 到 T_3 的转变作了研究,催化其他几种反应的研究还正在进行中。相信随着脱碘抗体酶工作的深入进行,将有助于更好地理解脱碘酶的催化机制,进一步促进半抗原的优化和抗体酶制备。

致谢:在甲状腺素的测量过程中曾得到白求恩医科大

学第一附属医院王全师教授和姚笛老师的大力支持。

REFERENCES:

- [1] Goswami A, Rosenberg IN. Iodothyronine 5'-deiodinase in rat kidney microsomes [J]. *J Clin Invest*, 1984, **74**(12): 2097 - 2106.
- [2] Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, et al. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level [J]. *Endocr Rev*, 1987, **8**(2): 288 - 308.
- [3] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily [J]. *Science*, 1988, **240**(4854): 889 - 895.
- [4] St Germain DL. Iodothyronine deiodinases [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1994, **5**(1): 36 - 42.
- [5] Safran M, Leonard JL. Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5'-deiodinase [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(5): 3233 - 3238.
- [6] Croteau W, Davey JC, Galton VA, et al. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in the human brain and other tissues [J]. *J Clin Invest*, 1996, **98**(2): 405 - 417.
- [7] Schoenmakers CH, Pigman IG, Kaptein E, et al. Reaction of the type III deiodinase with the affinity label N-bromoacetyl-triiodo-thyronine [J]. *FEBS Lett*, 1993, **335**(1): 104 - 108.
- [8] Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme [J]. *Nature*, 1991, **349**(6308): 438 - 440.
- [9] Vasil'ev AA, Engman L. Iodothyronine deiodinase mimics. Deiodination of *o*, *o'*-diiodophenols by selenium and tellurium reagents [J]. *J Org Chem*, 1998, **63**(12): 3911 - 3917.
- [10] Schultz PG, Lerner RA. From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system [J]. *Science*, 1995, **269**(5232): 1835 - 1842.
- [11] Ding L, Liu Z, Zhu ZQ, et al. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic [J]. *Biochem J*, 1998, **332**(1): 251 - 255.
- [12] Friguet B, Chaffotte AF, Ohaniance LD, et al. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Immunol Methods*, 1985, **77**(2): 305 - 319.
- [13] Lowery OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with Folin Phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265 - 275.
- [14] Klaymen DL, Griffin TS. Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents [J]. *J Am Chem Soc*, 1973, **95**(1): 199.
- [15] Bell IM, Fisher ML, Wu ZP, et al. Kinetic studies on the peroxidase activity of selenosubtilisin [J]. *Biochemistry*, 1993, **32**(14): 3754 - 3762.
- [16] Cavallini D, Graziani MT, Dupre S. Determination of disulphide groups in proteins [J]. *Nature*, 1966, **212**(5059): 294 - 295.
- [17] Leonard JL, Rosenberg IN. Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil [J]. *Endocrinology*, 1978, **103**(1): 2137 - 2144.

AN ABZYME TO CATALYZE THE DEIODINATION OF THYROXINE

LIAN Ge-wei¹, CHEN Mo¹, LIU Zi², DING Lan¹, ZHAO Da-qing¹, NI Jia-zuan¹

(1. Key Laboratory of Rare Earth Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 2. Institute of Military Veterinary Sciences, Changchun University of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Changchun 130021, China)

ABSTRACT: AIM To mimic an important family of selenoenzymes in organism thyroxine (T_4) deiodinases and prepare a selenium-containing abzyme catalyzing deiodination of T_4 . **METHODS** A anti- T_4 monoclonal antibody was generated by hybridoma methodology and converted into a selenium-containing abzyme by the method of chemical modification. The catalytic activity of the enzyme was measured by RIA method. **RESULTS** The abzyme displayed a marked activity of catalyzing deiodination of T_4 and a higher specificity to the substrate T_4 than that of natural enzyme, and the double reciprocal plots of the initial rates of T_3 formation vs. T_4 concentration yielded a family of parallel lines. The catalytic activity could be sensitively inhibited by 6-propyl-2-thiouracil (PTU), a competitive inhibitor for dithiothreitol (DTT). **CONCLUSION** An abzyme with the deiodination activity was first prepared and the reaction mechanism of the enzyme was bisubstrate ping-pong one.

KEY WORDS: selenium; thyroxine; deiodinase; abzyme; chemical modification