

大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶的研究

II. 大肠杆菌 AS 1.357 L-天门冬酰胺酶的提纯和性质

孟广震 钱世钧 郝凤兮 陈嘉懿 邱秀宝

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用硫酸铵盐析, 酒精分级沉淀, 酸处理和 DEAE-纤维素层析等方法, 从大肠杆菌 AS 1.357 的无细胞提取液中提纯 L-天门冬酰胺酶近 90 倍, 比活力达 200 单位/毫克蛋白质以上, 总收率约 18%。用葡聚糖凝胶 G-100 凝胶过滤法测定分子量约为 144500, 用等电点聚焦电泳测定等电点为 pH 4.6, 最适反应 pH 和温度分别为 7.0 和 55°C 左右, 酶的紫外吸收光谱最大吸收值在水溶液中为 278 毫微米, 在 0.1N NaOH 溶液中为 290 毫微米, 提纯各段均不含无抗活力的 EC-1 组份。酶的冷冻干燥制品在低温下保存一年未见任何酶活力损失。

在大肠杆菌 AS 1.357 产生 L-天门冬酰胺酶的培养条件研究之后^[1], 为获得符合临床规格的酶制剂必须进行酶的提纯。临床使用 L-天门冬酰胺酶制剂一般采用静脉注射的方法, 如果制剂中混有菌体蛋白、细菌内毒素和其他杂质势将引起较大的副作用^[2]。罗伯茨 (Roberts) 等^[3]曾用比活力为 20 单位/毫克蛋白质的制剂进行动物试验, 可引起兔体温升高 3—5°C, 而比活力为 80 单位/毫克蛋白质的制剂仅引起体温升高 0—1.5°C。本文报告大肠杆菌 AS 1.357 L-天门冬酰胺酶的提纯方法和该酶制剂的一些生物化学性质的研究结果。

材料和方法

一、丙酮细胞干粉的制备 从大肠杆菌 AS 1.357 的培养液中离心沉淀菌体, 然后用 4 倍体积冷丙酮处理, 过滤, 吹干, 粉碎。

二、提纯方法 取丙酮细胞干粉悬浮于 10 倍体积 0.01M 硼酸-硼酸钠缓冲液 (pH 8.0) 中, 于 37°C 浸提 1 小时, 加入 7.5% (v/v) 1M MnCl₂, 沉淀菌体碎片和核酸^[4], 离心取上清液即得 L-天

门冬酰胺酶无细胞提取液。向提取液中加入固体硫酸铵, 使达 43% 饱和度, 滤去沉淀的杂蛋白, 再补加硫酸铵至 85% 饱和度, 离心得沉淀, 用蒸馏水溶解, 通过葡聚糖凝胶 G-25 柱脱盐, 即得初步提纯的 L-天门冬酰胺酶。在冷却条件下向脱盐的酶液中加入 1.1 倍体积的酒精, 离心除去沉淀的杂蛋白, 用 1M 乙酸调节上清液 pH 至 4.7, 离心分离取得上清液和沉淀两部分。上清液部分加 0.5 倍体积酒精, 得沉淀 A; 沉淀部分用 0.01M KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (pH 8.0) 悬浮, 离心后得上清液, 加 2.0 倍体积酒精, 得沉淀 B。将 A、B 两部分沉淀用 0.01M pH 8.0 磷酸缓冲液溶解合并后, 即得纯度较高的 L-天门冬酰胺酶。取 DEAE-纤维素, 预先用 0.01M pH 8.0 磷酸缓冲液平衡, 酶液上柱后, 依次用 0.01M pH 8.0、0.03M pH 8.0 和 0.1M pH 6.4 磷酸缓冲液洗脱, 合并收集活力高峰洗脱液, 冷冻干燥后即得高纯度的 L-天门冬酰胺酶的干制品。

三、测定方法 酶活力测定方法按以前报告^[1]。蛋白质测定参照劳里 (Lowry) 等^[5]方法用福林 (Folin)-酚试剂测定。分子量测定参照安德鲁斯 (Andrews)^[6]的方法进行。用葡聚糖凝胶可

本文 1973 年 1 月 20 日收到。

以筛分子量不同的物质, 各物质的洗脱体积和分子量的对数值呈直线关系。预先将已知分子量的核糖核酸酶, α -糜蛋白酶, γ -球蛋白通过 1.5 × 45 厘米的葡聚糖凝胶 G-100 柱, 用含 0.1M NaCl 的 0.1M pH 6.0 醋酸缓冲液洗脱, 记录洗脱体积, 作标准曲线; 然后依同法测定 L-天门冬酰胺酶的洗脱体积, 即可在标准曲线中查知其分子量的对数。等电点的测定按维斯特伯格 (Vesterberg)^[7] 等电点聚焦法, 在 110 毫升 LKB-Ampholine 聚焦柱上进行, pH 梯度 3—10, 电压 700 伏, 聚焦 48 小时, 终点电流 1.75 毫安, 流出速度 1.7 毫升/分, 每管 2.5 毫升, pH 用 polymetron 42/B pH 计测定。紫外吸收光谱用 SP. 700°C 分光光度计连续扫描测定。

L-天门冬酰胺酶的提纯结果*

经上述方法提纯后, L-天门冬酰胺酶的比活力由 2.26 单位/毫克蛋白质提高到 200.6 单位/毫克蛋白质, 总收率 18.8% (表 1)。DEAE-纤维素层析结果如图 1 所示。

表 1 L-天门冬酰胺酶的提纯结果

提纯步骤	酶活力 (单位/毫升)	蛋白质 (毫克/毫升)	比活力 (单位/毫克蛋白质)	提纯 倍数	收率 (%)
无细胞提取液	16.3	7.2	2.26	1	100
硫酸铵盐析	85.0	11.1	7.65	3.9	50
酒精分段和酸处理	630.0	8.0	78.75	35.1	23.0
DEAE-纤维素层析	943.0	4.7	200.6	88.7	18.8

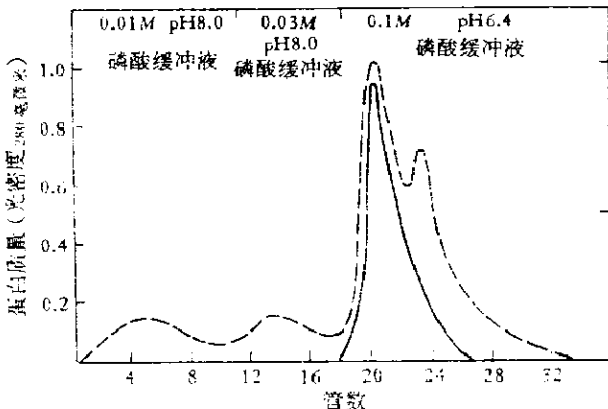


图 1 DEAE-纤维素分离 L-天门冬酰胺酶的层析图谱
16×1.6 厘米柱, 流速 0.33 毫升/分, 5 毫升/管。
---- 蛋白质 ——— 酶活力

L-天门冬酰胺酶的生化性质**

一、L-天门冬酰胺酶的最适反应温度和 pH

取比活力为 167 单位/毫克蛋白质的 L-天门冬酰胺酶, 在不同 pH 缓冲液或不同温度下测定酶活力。结果表明, 最适反应 pH、温度分别为 7.0 和 55°C 左右 (图 2, 图 3)。

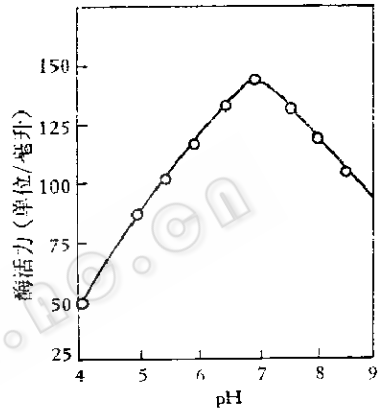


图 2 L-天门冬酰胺酶活力与 pH 的关系
pH 4—5.5 醋酸缓冲液, pH 6—7.5 磷酸缓冲液, pH 8—9 硼酸缓冲液

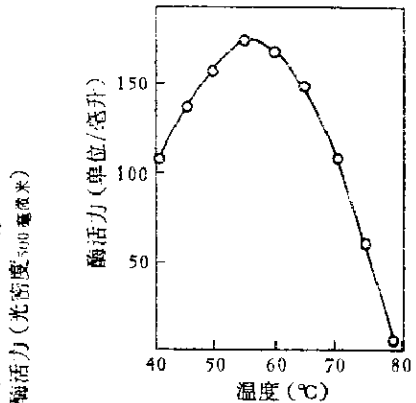


图 3 L-天门冬酰胺酶活力与温度的关系

* 部分提纯工作在天津河北制药厂和天津立新制药厂协作下完成。

** 部分生化性质的测定, 在本研究室结构与功能组协助下完成。

二、L-天门冬酰胺酶 EC-1 和 EC-2 组成的分析

据坎贝尔(Campbell)等^[4]报道,大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶有两个组份: EC-1 和 EC-2。两者虽然均可以分解 L-天门冬酰胺,但生化性质有差别,而且仅 EC-2 具有抗肿瘤作用。根据 pH 曲线计算这两个组份符合以下数学关系:

$$EC-1: \frac{\text{pH 5.0 时的酶活力}}{\text{pH 8.4 时的酶活力}} = 0.04$$

$$EC-2: \frac{\text{pH 5.0 时的酶活力}}{\text{pH 8.4 时的酶活力}} = 0.89$$

为确定 EC-2 的含量,并观察在提纯过程中它的含量变化,对不同提纯步骤的酶进行了该项比值测定,结果与报道中 EC-2 的数值相当接近(表 2),故认为大肠杆菌 AS 1.357 所产生的 L-天门冬酰胺酶为具

有抗癌活力的 EC-2。

表 2 不同纯度 L-天门冬酰胺酶 EC-1、EC-2 的组成分析

提纯步骤	pH 5.0 的酶活力 (单位/毫升)	pH 8.4 的酶活力 (单位/毫升)	pH 5.0 酶活力 pH 8.4 酶活力
无细胞提取液	7.5	8.8	0.85
硫酸铵盐析	60	63.2	0.95
酒精分段和酸处理	656	736	0.89
DEAE-纤维素层析	42.8	45.2	0.94

三、L-天门冬酰胺酶的保存试验

为考查 L-天门冬酰胺酶的稳定性,将提纯各段的 L-天门冬酰胺酶分别置于冰箱和室温下,间隔一定时间测定酶活力。实验结果如表 3 所示。一般说来, L-天门冬酰胺酶比较稳定,冷冻干燥纯制品在低温下保存一年,未见任何酶活力损失。

表 3 L-天门冬酰胺酶在保存期间活力的变化

提纯步骤	保存条件	保存期酶活力的变化 (%)*							
		5天	10天	20天	50天	100天	200天	300天	370天
丙酮细胞干粉	室温	98	95	89	73	—	—	—	—
硫酸铵盐析	室温	63	0	—	—	—	—	—	—
硫酸铵盐析	冰箱	93	61	—	—	—	—	—	—
酒精分段和酸处理	冰箱	100	99	98	—	—	—	—	—
DEAE-纤维素层析	冰箱	100	94	68	—	—	—	—	—
冷冻干燥成品	室温	100	100	100	98	94	88	82	77
冷冻干燥成品	冰箱	100	100	100	100	100	100	100	100

* 保存开始时(0时)的酶活力为 100%。

四、L-天门冬酰胺酶的分子量

取比活力为 171 单位/毫克蛋白质 L-天门冬酰胺酶样品 2.8 毫克,通过 1.5×45 厘米葡聚糖凝胶 G-100 柱的洗脱体积为 21.5 毫升,从标准曲线查知分子量的对数为 5.16,计算其反对数,即得分子量的近似值为 144500(图 4)。阿伦斯(Arens)等^[8]

用葡聚糖凝胶 G-200 薄层层析法测得结果为 110000—120000,中村(Nakamura)等^[9]用沉降法测定结果为 141000。

五、L-天门冬酰胺酶的等电点

取比活力为 218 单位/毫克蛋白质的 L-天门冬酰胺酶样品 10 毫克进行等电点聚焦电泳。结果表明,等电点为 pH 4.6(图

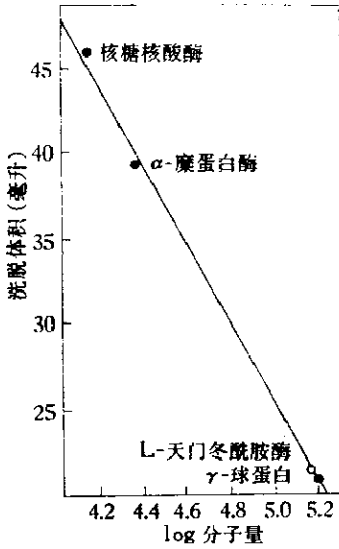


图4 葡聚糖凝胶 G-100 过滤法测定 L-天门冬酰胺酶分子量

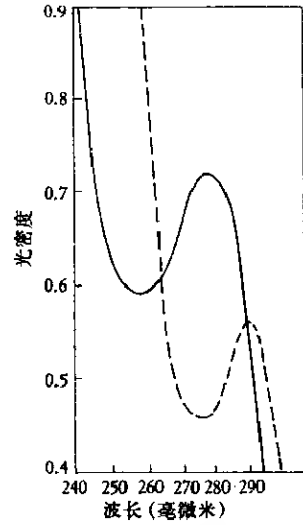


图6 L-天门冬酰胺酶的紫外吸收光谱
——水溶液 - - - - 0.1N NaOH 溶液

5)。电泳图谱显示在 280 毫微米的光吸收仅有一个主峰,并与活力峰重合。中村等^[9]测定的等电点为 4.75。

讨 论

用本文报告的提纯方法将 L-天门冬酰胺酶提纯近 90 倍,比活达 200 单位/毫克蛋白质,与国外同类商品——日本协和发酵株式会社的 leunase 和西德拜耳公司的 crasnitin 的比活相似。大肠杆菌 (*E. coli*) AS 1.357 L-天门冬酰胺酶对大鼠 Walker 256 癌肉瘤有明显的抑制作用。临床试验表明,该制剂也可诱导某些急性白血病的缓解。

L-天门冬酰胺酶虽广泛存在于各种生物体内,但并非所有来源的酶制品都具有抗癌作用^[10],如酵母^[11]、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)^[12] 的 L-天门冬酰胺酶即不具抗癌作用。大肠杆菌的 L-天门冬酰胺酶的抗癌作用虽早已被马什本 (Mashburn) 等^[12]证实,但后来坎贝尔等^[4]从 *E. coli* B 菌株分离得到 EC-1, EC-2 两个 L-天门冬酰胺酶组份,并且仅 EC-2 有抗癌作用。本文报告的大肠杆菌 (*E. coli*) AS 1.357 菌株的 L-天门冬酰胺酶不含有无抗癌作用的 EC-1,提纯制品的许多生物化学

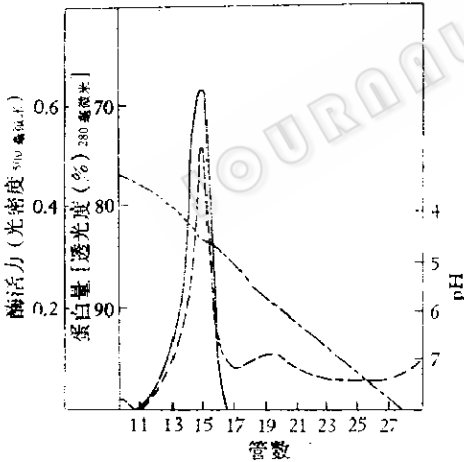


图5 L-天门冬酰胺酶等电点聚焦电泳图谱
- - - - 蛋白质 ——酶活力 - · - · - pH

六、L-天门冬酰胺酶的紫外吸收光谱

取比活力 167 单位/毫克蛋白质的 L-天门冬酰胺酶,分别溶解于蒸馏水和 0.1 N NaOH 中,在 240—300 毫微米测定光密度,水溶液样品的最大吸收在 278 毫微米,0.1N NaOH 溶液样品的最大吸收在 290 毫微米(图 6)。

性质与 EC-2 颇相一致,这是大肠杆菌 (*E. coli*) AS 1.357 菌株的重要特点。

参 考 资 料

- [1] 邱秀宝、郝凤兮、钱世钧、陈嘉懿、孟广震: 微生物学报 **13** (1): 59—62, 1973.
- [2] Oettgen, H. F., et al.: *Cancer*, **25**(2): 253—278, 1970.
- [3] Roberts, J., Burson, G., Hill, J. M.: *J. Bacteriol.*, **95**(6):2117—2123, 1968.
- [4] Campbell, H. A., Mashburn, L. T., Boyse, E. A., Old, L. T.: *Biochemistry*, **6**:721—730, 1967.
- [5] Lowry, O. H., et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [6] Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**:595—606, 1965.
- [7] Vesterberg, O.: *Methods in Enzymology* (W. B. Jakoby ed), **22**:389—411, Academic Press, New York and London, 1971.
- [8] Arens, A., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**:197—212, 1970.
- [9] Nakamura, N., Tanaka, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**(2):219—225, 1971.
- [10] Adamson, R. M., Fabro, S.: *Cancer Chemotherapy Rep.*, **52**(6): (Part 1), 617—626, 1968.
- [11] Broome, J. D.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**: 967, 1965.
- [12] Mashburn, L. T., Wriston, J. C., Jr.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**(2): 450—452, 1964.

STUDIES ON THE L-ASPARAGINASE OF *ESCHERICHIA COLI* AS 1.357

II. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE L-ASPARAGINASE FROM *ESCHERICHIA COLI* AS 1.357

MENG GUANG-ZHEN, QIAN SHI-JUN, HAO FENG-XI,
CHEN JIA-YI AND QIU XIU-BAO

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

L-asparaginase, an antitumor enzyme, has been isolated from the cell-free extract of *Escherichia coli* AS 1.357 and purified approx. 90-folds by a combination of ammonium sulfate precipitation, ethanol fractionation, acid treatment and chromatography on DEAE-cellulose. The specific activity of the L-asparaginase preparation is over 200 i.u./mg protein with an overall recovery of about 18%. The molecular weight was estimated to be about 144,500 by the Sephadex G-100 gel filtration method, and the isoelectric

point was found to be 4.6 by isoelectric focusing. The optimum pH for the enzyme is 7.0, optimum temperature, 55°C, and the maximum absorption of UV-spectra is at 278 nm in water, and at 290 nm in 0.1N NaOH. L-asparaginase of the type EC-1 which has no antitumor activity, has not been observed in all purification steps. Lyophilized preparations of L-asparaginase can be kept for one year at lower temperature, without any loss of activity.