

大肠杆菌 (*Escherichia coli* AS 1.357)
L-天门冬酰胺酶的研究

III. L-天门冬酰胺酶的结晶*

孟广震 钱世钧*
(中国科学院微生物研究所, 北京)

用 α -甲基戊二醇-2,4 沉淀法从大肠杆菌 AS 1.357 获得 L-天门冬酰胺酶的结晶。结晶用免疫扩散和免疫电泳分析表现均一, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳后有两个蛋白质区带, 都具有 L-天门冬酰胺酶活力, 用不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果证明, 不同迁移率的区带之分子量成整倍数变化, 所带净电荷一致, 系 L-天门冬酰胺酶的单体和二聚体。

L-天门冬酰胺酶已用于白血病治疗, 具有缓解率高, 见效快, 对骨髓没有抑制作用, 与其他抗癌药物无交叉耐药性等优点^[1,2]。在临床上如采用高纯度的结晶 L-天门冬酰胺酶可以进一步减少某些副作用。此外, 为了在分子水平上较深入地探讨 L-天门冬酰胺酶的一些理论问题, 制备结晶态酶制品也是较为必要的。本文报告大肠杆菌 AS 1.357 L-天门冬酰胺酶结晶的制备方法及其性质的研究结果。

L-天门冬酰胺酶的结晶

取部分提纯的 L-天门冬酰胺酶 500 毫克, 溶于 6 毫升蒸馏水, 对水透析, 再用含 0.01 M 甘氨酸的 0.0625 M pH 8.0 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾透析平衡过夜, 离心得上清液, 用 2 M 醋酸调至 pH 4.9, 于 22—24℃ 室温下搅拌滴加 0.6 倍体积的 α -甲基戊二醇-2,4, 转入冰箱 (8℃) 静置 1.5 小时, 离心取上清液, 再依同样方法滴加甲基戊二醇至 0.8 体积, 转入冰箱静置 3 小时, 离心取沉淀, 溶于 2 毫升 0.01 M pH 5.0 醋酸-

醋酸钠缓冲液, 小心滴加甲基戊二醇至轻微混浊, 立即离心得上清液, 再滴加甲基戊二醇少许至轻微混浊, 于冰箱中放置 3 小时后观察有丝光状混浊, 用偏光显微镜观察有细棒状晶体物, 一般 24 小时内结晶完全, 初步结晶中有时混有无定形物, 重复操作可得到纯度基本稳定的重结晶 (下表, 图版 1-1)。

L-天门冬酰胺酶结晶的实验结果

步 骤	酶活力 (单位)	蛋白质 (毫克)	比 活 力 (单位/毫克蛋白质)	收率 (%)
起始酶液	28200	227.0	124	100
第一次结晶	8600	50.5	172	30.5
第二次结晶	7200	30.2	238	25.5
第三次结晶	5320	21.1	251	18.9

本文于 1973 年 12 月 3 日收到。

本文主要内容曾于 1973 年 7 月在天津召开的药品鉴定会上宣读。

* 承天津生物化学制药厂提供部分提纯的酶制品, 并协助制备抗血清, 蒙徐浩和乔宝义同志协助显微照相, 严自正同志进行 N-末端测定, 一并致谢。

L-天门冬酰胺酶重结晶的纯度

1. 用琼脂凝胶免疫扩散和 免疫电泳法鉴定

有关实验方法作者^[2]曾有过详细描述,此处仅说明以下几点:(1)家兔抗血清的抗体效价在 100—1000 之间;(2)免疫扩散在室温下连续进行 48 小时;(3)免疫电泳所用缓冲液为 0.025 M pH 8.4 巴比妥钠-盐酸缓冲液,在 100 伏特电压下电泳 1.5 小时。用以上两种方法鉴定结果表明,结晶 L-天门冬酰胺酶已达均一状态(图版 1-2,3)。

2. 用聚丙烯酰胺凝胶 电泳法^[3]鉴定

除特别注明外一般采用 7% 凝胶,电极缓冲液为 pH 8.3 Tris 缓冲液,凝胶柱为 6 × 60 毫米,样品量约 100 微克,每管电流 3 毫安,电泳约 90 分钟,电泳后用 0.5% 氨基黑 10 B 作蛋白质染色。结果如图版 1-3,4 所示。结晶前至少有三个区带(F, M, S),结晶后仅存两个区带(F, M),而且电泳迁移率大的 F 区带占被分离蛋白质的绝大部分。

L-天门冬酰胺酶的多聚体

Марлашев 等^[4]以聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定其所获得的结晶 L-天门冬酰胺酶时,也发现两个区带,但较小的区带被该作者忽略不计,认为已达均一状态。Nakamura 等^[5]所得结晶也有相似现象,该作者认为迁移率较小的区带为 L-天门冬酰胺酶分子解离的亚基。而我们下述实验证明,结晶酶电泳后的两个区带为该酶的多聚体。

1. L-天门冬酰胺酶电泳区带的特异性

为了确定有 L-天门冬酰胺酶活力的电泳区带的位置,除作一般蛋白质染色外,还参照 Paidak 等^[6]报告的方法进行酶活力的特异性鉴别。将电泳毕之凝胶平铺于载玻片上,然后浇注一薄层下述显色系统:含 0.8% 琼脂、0.13% L-天门冬酰胺和 0.175% 四苯基硼钠的 pH 8.0 Tris 缓冲液。待凝固后,于 37℃ 保温 30 分钟,然后浸入 7% 醋酸以终止反应。在保温过程中,凝胶上的 L-天门冬酰胺酶催化 L-天门冬酰胺分解,释放出的铵与四苯基硼钠反应生成白色沉淀,依据白色沉淀可判定凝胶上的 L-天门冬酰胺酶区带的位置。染色结果如图 1 所示, F, M, S 三个区带均有白色沉淀,也即都具 L-天门冬酰胺酶的活力。

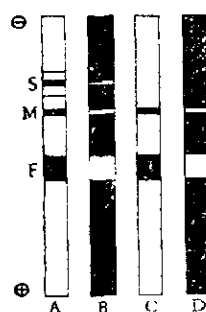


图 1 L-天门冬酰胺酶聚丙烯酰胺凝胶电泳示意图

A 和 B 为结晶前, C 和 D 为结晶后;
A 和 C 用氨基黑 10 B 染色,
B 和 D 用四苯基硼钠染色。

2. 各电泳区带的相对迁移率分析

按 Hedrick^[7] 原理,在不同浓度凝胶条件下测定不同区带的相对迁移率,以凝胶浓度对相对迁移率的对数值作图,各区

带的座标点连接线的延伸线汇交一点者为分子大小不同的异构物,彼此平行者为电荷不同的异构物,相互交叉者为分子大小及电荷均不相同的异构物。L-天门冬酰胺酶的三个电泳区带属第一种情况,即分子大小不同而电荷(表面电荷密度)相同的异构物(图版 I-5, 图 2)。当各物质带的电荷相同时,迁移率主要受分子筛作用的影响^[8]。分子量较小者电泳迁移率较大,那么分子量较小的亚基就不会比完整的 L-天门冬酰胺酶分子迁移率更小,因此,不能认为电泳迁移率较小的 M 或 S 区带为 L-天门冬酰胺酶的亚基。

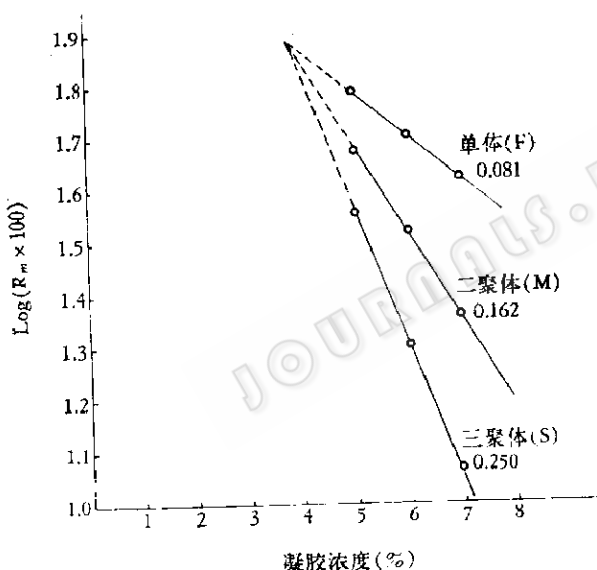


图 2 L-天门冬酰胺酶凝胶电泳相对迁移率(R_m)的对数值与凝胶浓度的关系
图中数字为该线负斜率。

3. 各区带分子量的分析

分子量的分析将提供 M 和 S 区带是 L-天门冬酰胺酶多聚体的直接证据。按

Hedrick 等^[7]证明的原理,在图 2 的坐标系中,对应于各直线的负斜率与分子量成直线关系,从图中求得 F, M, S 三条直线的负斜率分别为 0.081, 0.162 和 0.250, 其比值近似于 1:2:3。已知 L-天门冬酰胺酶的主要成分(F)的分子量为 144500^[9], M 和 S 分别为 L-天门冬酰胺酶的二聚体和三聚体,各自的分子量应为 144500×2 和 144500×3 (图 2)。

以上证据表明,结晶前样品在凝胶电泳中出现的三个主要区带(F, M, S),为 L-天门冬酰胺酶单体、二聚体和三聚体,结晶后的两个区带(F, M)为该酶的单体和二聚体。M 区带既不是酶的亚基,也不是其他无关的杂质。在这种意义上讲聚丙烯酰胺凝胶电泳也已达到均一。

此外,结晶 L-天门冬酰胺酶用 8 M 尿素处理后,再在 8 M 尿素条件下电泳,仅得一个电泳区带;测定酶的 N-末端,仅发现是亮氨酸,这不但说明酶是均一的,而且也与多聚体的结论相互印证。

参 考 资 料

- [1] 孟广震等: 科学通报, 19 (8): 376—378, 1974.
- [2] 孟广震: 微生物学通报, 1: 29—36, 1974.
- [3] 张树政等: 化学通报, 1: 30—38, 1973.
- [4] Мардашев, С. Р., и др.: Вопросы Медицинской химии, 18(3):318—321, 1972.
- [5] Nakamura, N. et al.: Agr. Biol. Chem., 35(2):219—225, 1971.
- [6] Pajdak, E. et al.: Anal. Biochem., 50: 317—320, 1972.
- [7] Hedrick, J. L. et al.: Arch. Biochem. Biophys., 126(1):155—164, 1968.
- [8] Smithies, O.: Arch. Biochem. Biophys. Suppl., 1:125—131, 1962.
- [9] 孟广震等: 微生物学报, 13 (2): 102—106, 1973.

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

III. CRYSTALLIZATION OF L-ASPARAGINASE

MENG GUANG-ZHEN AND QIAN SHI-JUN

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Crystalline L-asparaginase has been obtained from *E. coli* AS 1.357 with 2-methylpentanediol-2,4 as a precipitant. It was homogeneous on immunodiffusion and immunoelectrophoresis analysis. The polyacrylamide gel disc-electropherogram exhibited two bands, both showed L-

asparaginase activity. Disc-electrophoresis carried on gels of different concentrations showed that, these bands have identical charges but different molecular size. They are monomer and polymer of L-asparaginase.