

多聚唾液酸对 L-天冬酰胺酶的修饰及修饰酶特性研究

王颖达 郭 丽 钱世钧* 孟广震 张树政

(中国科学院微生物研究所酶学研究室 北京 100080)

关键词 L-天冬酰胺酶, 多聚唾液酸, 免疫原性, 抗原性, 蛋白酶水解

中图分类号 Q816 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0517-04

来源于大肠杆菌(*E. coli*)的 L-天冬酰胺酶是治疗淋巴性白血病和恶性淋巴瘤的有效酶制剂,已应用于临床。该酶与其他蛋白质类药物一样,在临床应用中存在两个常见问题:一是酶制剂在体内易被降解,导致半衰期短;二是免疫原性。为了解决上述问题,人们用亲水性的大分子如血清蛋白、右旋糖苷和单甲氧基聚乙二醇(mPEG)对该酶进行修饰。其中 mPEG^[1]修饰后的 L-天冬酰胺酶的抗原抗体结合能力完全消失,免疫原性下降,且体内半衰期延长,但酶活力只有天然酶的 8%~14%,且 mPEG 在人体组织中无法降解,目前尚难评估长期使用后对人体所造成的影响。

最近 Gregoriadis 等人^[2]认为可以使用多聚唾液酸代替 mPEG 分子来修饰药物。多聚唾液酸是 N-乙酰神经氨酸的多聚分子,经证明其降解产物对人体无害^[2]。目前仅有 Ana 等人^[3]用多聚唾液酸对 *Er. chrysanthemi* 的 L-天冬酰胺酶进行了修饰。而临床应用的 L-天冬酰胺酶主要是来源大肠杆菌。所以本文以多聚唾液酸为修饰剂,对工程菌 *E. coli* ASI.357(pASN)产生的 L-天冬酰胺酶进行修饰,研究修饰酶的底物亲和力、酶的稳定性、抗原性和免疫原性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种:多聚唾液酸产生菌 *E. coli* C-8 由本实验室筛选得到^[4]。产 L-天冬酰胺酶的工程菌 *E. coli* ASI.357(pASN),由本实验室构建。

1.1.2 试剂:Dowex1×8 为 Sigma 公司产品,Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品,DE11 为 Whatman 产品。标准多聚唾液酸为 Fluka 产品,分子量标准蛋白为上海东风生化试剂厂产品,NaIO₄ 和 NaCNBH₃ 为 Sigma 公司产品。胰蛋白酶(Trypsin)和大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor)均为 Sigma 公司产品。葱酮试剂:2 g 葱酮溶于 1 L 浓硫酸(当日配制使用)。R-试剂:10 mL 2% 间苯二酚,80 mL 浓盐酸,0.25 mL 0.1 mol/L 硫酸铜,加水至 100 mL。

1.2 方 法

1.2.1 多聚唾液酸含量的测定^[5]:0.1 mL 样品加入 1.9 mL H₂O 和 2 mL R-试剂,沸水浴中煮 15 min,冷水浴中冷却后,加入 4 mL 丁酸丁酯:正丁醇(85:15),剧烈振荡后,放置 10 min,取有机相于 580 nm 测定吸收值。

1.2.2 多聚唾液酸的纯化:收集 *E. coli* C-8 的发酵液,加入(NH₄)₂SO₄ 至 50% 饱和度,菌体离心沉淀后,取上清液超滤浓缩;于浓缩液中加入(NH₄)₂SO₄ 至 50% 饱和度,室温放置 1 h,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液对蒸馏水透析过夜。将样品液进行 Dowex-1×8 柱层析(2.5 cm×60 cm),Dowex-1×8 树脂柱用蒸馏水平衡后,上样,用 100 mL 蒸馏水洗脱,再用 300 mL 1 mol/L HAc-NaAc(pH4.6)缓冲液洗脱,收集多聚唾液酸洗脱峰,将收集的多聚唾液酸浓缩,透析,冻干,放-20℃保存。

1.2.3 多聚唾液酸的平均分子量的测定:纯化后的多聚唾液酸经聚丙烯酰胺电泳分离^[6],以标准多聚唾液酸(25 kD)为对照,测得二者的迁移率,估算出多聚唾液酸的平均分子量。

1.2.4 L-天冬酰胺酶的纯化:L-天冬酰胺酶的纯化参考文献^[7]。

1.2.5 多聚唾液酸的激活^[8]:将 200 mg 纯化的多聚唾液酸与 20 mL 0.1 mol/L 高碘酸钠混合,20℃,避光搅拌或振荡 15 min。加入 40 mL 乙二醇终止反应,并继续搅拌或振荡 30 min。反应液在 0.02%(NH₄)₂CO₃ 溶液中透析 24 h。

1.2.6 多聚唾液酸对 L-天冬酰胺酶的修饰反应^[3]:将 L-天冬酰胺酶酶液与等体积的 1.5 mol/L K₂HPO₄ 溶液混合后,加入 NaCNBH₃(NaCNBH₃:酶=1:4000,克分子比),然后再加入一定量的激活的多聚唾液酸。将上述溶液放入密封管中,37℃ 搅拌或振荡 24 h。将反应液用硫酸铵沉淀或分子筛层析分离去除未反应的试剂。将修饰的 L-天冬酰胺酶冻干保存。

1.2.7 酶制剂的抗血清的制备及免疫双扩散法:均参考文献^[9]。

1.2.8 免疫沉淀曲线的测定^[9]:将抗原稀释成 1 mg/mL

浓度,在小离心管中分别加入 30 μ L 至 500 μ L 不同体积的抗原,各加入抗血清 100 μ L,对照是不加抗原只加入 100 μ L 抗血清。于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 h,而后于 4 $^{\circ}$ C 放置 3 d。离心取沉淀,加 1 mL 0.1 mol/L NaOH 溶解沉淀。测定吸收值 A_{280} 。

2 结 果

2.1 多聚唾液酸的纯化及分子量的测定

多聚唾液酸粗品经 50% 硫酸铵沉淀后,去除了部分蛋白,经柱层析分离后,收集含多聚唾液酸的洗脱峰,多聚唾液酸的回收率为 20.7%。

将收集峰直接测定 A_{260} ,吸收值为 0.09,说明洗脱峰中基本不含核酸。Folin 法测定洗脱峰中的蛋白含量,洗脱峰的 A_{280} 的吸收值约为 0,表明 Dowex1 \times 8 柱层析可很好地去除杂蛋白。蒽酮法测定^[6] 2 mg/mL 多聚唾液酸样品, A_{620} 吸收值为 0.11,由标准曲线查得糖含量约为 20 μ g/mL,占总样品量的 1%,这表明洗脱峰中蒽酮阳性的糖类在样品总量中不超过 1%。以上结果都符合文献 [10] 中对多聚唾液酸的产品纯度标准的规定。通过分子量的测定,所得的多聚唾液酸的平均分子量约为 30 kD。

2.2 多聚唾液酸对 L-天冬酰胺酶的修饰反应

L-天冬酰胺酶与高碘酸钠激活的多聚唾液酸在 NaCNBH₃ 的作用下,通过还原氨基化反应结合。NaCNBH₃ 可还原唾液酸单体上的非还原末端与酶的自由氨基之间形成的 Schiff 碱基而使它们结合。

将多聚唾液酸与 L-天冬酰胺酶分别为 30:1,50:1 和 100:1 的摩尔比混合进行反应,将反应液进行 Sephadex G-100 柱层析以分离修饰酶和未反应的多聚唾液酸和 L-天冬酰胺酶。收集既含多聚唾液酸又有 L-天冬酰胺酶活力的洗脱峰(图 1),并以洗脱峰的多聚唾液酸含量与 L-天冬酰胺酶蛋白含量之比计算修饰程度。结果(表 1)表明,随着多聚唾液酸与 L-天冬酰胺酶的摩尔比的提高,修饰程度相应提高,但修饰酶活力随修饰程度的增加而降低。

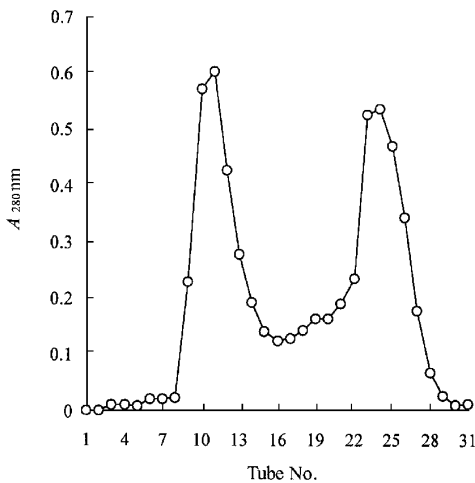


图 1 Sephadex G-100 分离修饰酶纯化曲线

表 1 多聚唾液酸修饰酶的修饰程度及酶活力

Molar ratio of colominic acid/enzyme	Number of colominic acid per enzyme molecule	Enzyme activity /%
30:1	4.7	58
50:1	7.6	56
100:1	12	33.2

我们发现修饰酶在经 PAGE 电泳(图 2)分离时,难以入胶。这一现象类似于文献 [11] 报道中用 mPEG 修饰的牛血清白蛋白电泳时的现象。推测可能是修饰后分子量增大或连接的多聚唾液酸链的空间阻碍所致。

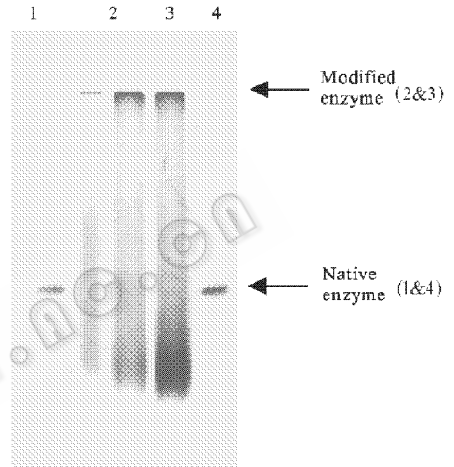


图 2 PAGE 电泳分析天然酶与修饰酶

2.3 修饰酶的抗原抗体结合能力测定

取天然酶和修饰酶(浓度均为 0.8 mg/mL)作抗原,天然酶的抗血清为抗体,双扩散法测定抗原抗体结合能力。由图 3 可见,修饰酶的抗原抗体结合能力比天然酶的弱,即修饰酶的抗原性低于天然酶的抗原性。这一结论从免疫沉淀曲线测定的结果(图 4)也得到了证实。

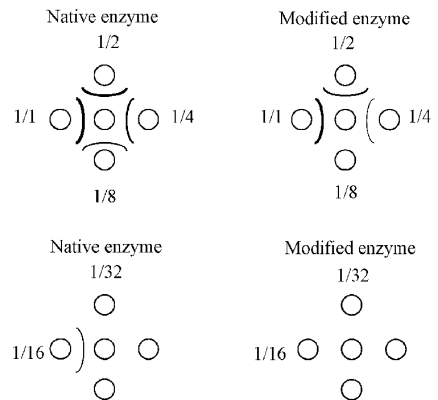


图 3 双扩散法测定天然酶和修饰酶的抗原抗体结合能力

Antigen :Asparaginase and modified asparaginase with colominic acid ;
Antibody :Anti-serium of asparaginase

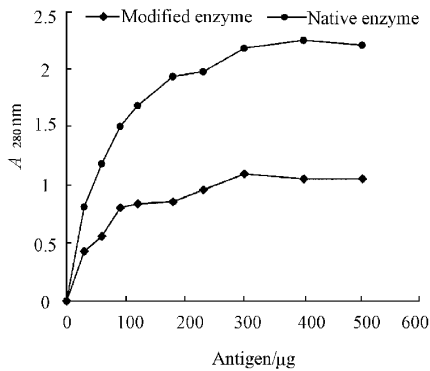


图4 天然酶与修饰酶的免疫沉淀曲线

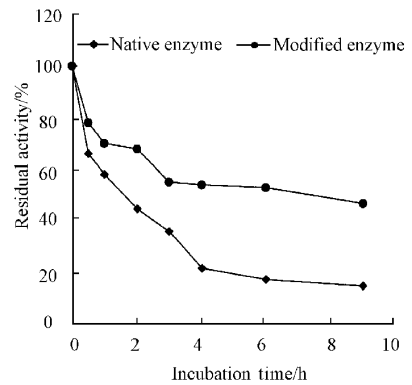


图6 天然酶与修饰酶的体外半衰期

2.4 修饰酶的免疫原性

将天然酶和修饰酶以每次 0.5 mg 的量免疫家兔,得各自的抗血清,利用双扩散法测定二者的效价。天然酶的抗血清效价为 2^4 ,而修饰酶的效价为 2^2 ,这说明经多聚唾液酸的修饰可使酶制剂的免疫原性降低。

2.5 天然酶与多聚唾液酸修饰酶抗胰蛋白酶能力比较

取修饰酶与天然酶各 1 mL (0.5 mg/mL),加入 $10\mu\text{L}$ 1 mg/mL 胰蛋白酶 (827 Bet unit/mg), 37°C 水浴保温,测定不同时间 L-天冬酰胺酶活力。结果从图 5 可见,修饰酶经胰蛋白酶水解 30 min 后,酶活力仍保留约 40%,而相同条件下天然酶的酶活力仅为 6%。这表明多聚唾液酸的修饰可增强 L-天冬酰胺酶的抗胰蛋白酶水解能力。

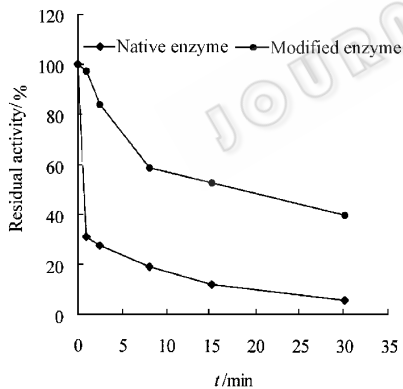


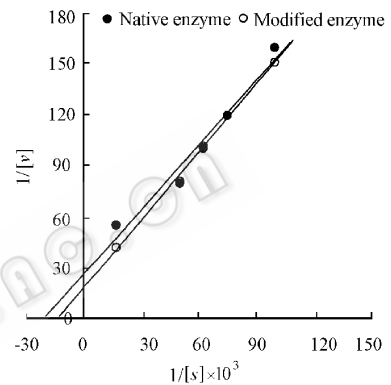
图5 天然酶与修饰酶对胰蛋白酶的抗性

2.6 修饰酶的体外半衰期测定

将 1 mg 天然酶与修饰酶分别溶于 4 mL 新鲜人血清中, 37°C 保温,于不同时间测定酶活力,结果(图 6)表明,修饰酶的体外半衰期(6 h)比天然酶的(2 h)明显延长。

2.7 天然酶与修饰酶对底物 L-天冬酰胺的 K_m 值的测定

以双倒数作图法,求得天然酶及修饰酶对底物 L-天冬酰胺的表观米氏常数,分别为 $7.11 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $4.76 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (图 7)。表明修饰酶对底物的亲和力比天然酶略高。说明多聚唾液酸对 L-天冬酰胺酶的修饰,未对该酶的米氏常数产生负面影响。

图7 天然酶与修饰酶的 K_m 测定

3 讨论

以上修饰反应的结果与已报道的多聚唾液酸对 *Er. chrysanthami* 的 L-天冬酰胺酶的修饰结果比较:在多聚唾液酸与 L-天冬酰胺酶摩尔比相同的情况下,我们的修饰程度较高,如:在多聚唾液酸与 L-天冬酰胺酶摩尔比为 50:1 的反应中,文献 [3] 中的修饰程度为 5.8,本实验中修饰程度为 7.6;但本实验中的酶活力为 56%,较文献报道的酶活力(86.5%)低,对此还需进一步地研究。另外,本文研究了修饰酶的稳定性和抗原性和免疫原性等方面的特性,而 Ana 等人 [3] 未进行这些性质研究。

mPEG [11,12] 对酶进行修饰时,酶的稳定性的明显提高,文献 [12] 中推测 mPEG 与蛋白质分子结合后,由于修饰程度较高,其 mPEG 长链在溶液中可在蛋白质周围自由移动,对蛋白质起到了保护作用,使蛋白质的稳定性提高。多聚唾液酸修饰 L-天冬酰胺酶的修饰程度低于 mPEG,但多聚唾液酸是有高度亲水性和负离子性质的,当多聚唾液酸链一旦附着在 L-天冬酰胺酶分子上,它与相邻的带相反电荷的氨基酸残基相互作用,在蛋白质分子表面就形成了亲水层,从而使酶分子的内部得到保护。另外,也不能排除经多聚唾液酸修饰的 L-天冬酰胺酶的四级结构有所变化,导致对蛋白酶不敏感的可能性。

参 考 文 献

- [1] Ashihara Y. *Biochem Biophys Res Commun* ,1978 **83** 385~392
- [2] Gregoriadis G ,McCrmark B ,Wang Z *et al* . *FEBS Lett* ,1993 **215** 271~277
- [3] Ana I F ,Gregory G ,*Biochim Biophys Acta* ,1997 **1341** 26~34
- [4] 郭良栋 ,钱世钧 ,叶 军等 ,*微生物学报* ,1998 **38** :103~107
- [5] Sovennerholm L. *Biochim Biophys Acta* ,1957 **24** 604~611
- [6] 张惟杰主编 ,*糖复合物生化研究技术* 杭州 浙江大学出版社 ,1994 pp. 120~122
- [7] 孟广震 ,钱世钧 ,郝凤兮等 .*微生物学报* ,1973 **6** :102~106
- [8] 程玉华 ,曹淑桂 ,赵秋宇等 .*生物化学杂志* ,1988 **4** 28~32
- [9] 王重庆 ,李云兰 ,李德昌等编 .*高级生物化学实验教程* 北京 北京大学出版社 ,1994 pp. 122~127
- [10] Edward J M , Stephen B B. *Biochemistry* ,1964 **3** 247~254
- [11] Abuchowski A. *J Biol Chem* ,1977 **252** 3578~3581
- [12] Veronese F M , Sartore L , Schiavonand O *et al* . *Ann New York Acad Sci* ,1990 **613** 468~473

Modification of L-asparaginase with Colominic Acid and the New Characteristics of the Modified Enzyme

WANG Ying-Da GUO Li QIAN Shi-Jun MENG Guang-Zhen ZHANG Shu-Zheng
(*Department of Enzymology ,Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080*)

Abstract The colominic acid was covalently coupled to L-asparaginase molecule by reductive amination. Depending on the molar ratios of colominic acid-asparaginase (30:1 ,50:1 and 100:1) , a modified enzyme molecule contained 4.7 ,7.2 and 12 colominic acid molecule ,they retained 58% ,56% and 33.2% of the initial asparaginase activity ,respectively. In comparison with the native enzyme ,modified enzyme had lower immunogenicity and antigenicity ,longer half-life time (*in vitro*) ,more resistance ability to trypsin proteolysis ,and similar K_m value for L-asparagine.

Key words L-asparaginase ,colominic acid ,immunogenicity ,antigenicity ,proteolysis