DOI:10.16016/j.1000-5404.202010006

肽脱甲酰基酶在偶极离子修饰亲水磁珠表面的固定化及表征

李欣蓬,杨林玉,段昌园,杨晓兰 400016 重庆,重庆医科大学检验医学院,临床检验诊断学教育部重点实验室

[摘要] **目的** 比较表面修饰偶极离子且带 Ni^{2+}-NTA 或羧基的两种亲水磁珠对结核分枝杆菌肽脱甲酰基酶(*Mycobacterium tuberculosis* peptide deformylase,*Mt*PDF)的固定化效果,探讨适于磁分离联用 HPLC-MS 筛选 *Mt*PDF 配体混合物库的靶酶固定化方案。**方法** 将 N 端带有 6×His 标签 *Mt*PDF 的质粒 pET-28a(+)导入 *E. coli* BL21(DE3)重组表达,使用镍离子螯合亲和层析介质纯化后表征其酶学性质。将 *Mt*PDF 与 Ni^{2+}-NTA 或羧基磁珠偶联并比较其固定化容量、保留活性、固定化前后酶稳定性及对抑制剂放线酰胺素(Actinonin)的响应。**结果** Ni^{2+}-NTA 磁珠固定 *Mt*PDF 的容量为(99.7±4.5) mg/g (n=3);最优投料比酶量∶磁珠量=1∶15 时,固定化酶保留活性为(107.2±13.9)% (n=3),在 0 ℃、pH=7.5 缓冲液中振摇 3 h 活性仅保留 43%。羧基磁珠活化后通过酰胺键共价固定 *Mt*PDF 的容量为(36.9±2.6) mg/g (n=3);最优投料比酶量∶磁珠量=1∶60 时,固定化酶保留活性为(102.6±15.4)% (n=3),与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化保留活性相当;在 0 ℃、pH 7.5 缓冲液中振摇 8 h 活性无显著改变;羧基磁珠固定化酶对 Actinonin 的抑制响应与游离酶无显著差异(P>0.05)。**结论** 羧基磁珠固定化 *Mt*PDF 酶活更稳定,不影响抑制剂响应,适于混合物库中 *Mt*PDF 高亲和力配体筛选。

[关键词] 磁珠固定化;肽脱甲酰基酶;结核;筛选

[中图法分类号] R378.91;R931.6;R965.1 [文献标志码] A

Immobilization and characterization of peptide deformylase on surface of ampholytic ion modified hydrophilic magnetic beads

LI Xinpeng, YANG Linyu, DUAN Changyuan, YANG Xiaolan Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the immobilization effect of 2 kinds of hydrophilic magnetic beads with Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid (Ni^{2+}-NTA) group or carboxyl group and surface modified by ampholytic ions on *Mycobacterium tuberculosis* peptide deformylase (*Mt*PDF), and to determine the target enzyme immobilization scheme appliable to screening *Mt*PDF ligand mixture library using magnetic separation combined with high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). **Methods** The plasmids pET-28a(+):def with N-terminal 6×His tagged *Mt*PDF was successfully constructed and transfected into *E. coli* BL21(DE3) for *Mt*PDF recombinant expression. The products were collected and purified using nickel-ion chelating affinity chromatography column, and then identified with the enzymatic properties. Then the obtained *Mt*PDF was coupled to magnetic beads with Ni^{2+}-NTA (*Mt*PDF-Ni^{2+}-NTA) or carboxyl group (*Mt*PDF-carboxy), respectively. The immobilization capacity, enzyme activity, enzyme stability before and after immobilization,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31570862,81773625)

[通信作者] 杨晓兰,E-mail:xiaolanyang666@yeah.net

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and the response to the inhibitor actinonin were compared between the 2 schemes. **Results** The immobilization capacity of *Mt*PDF-Ni^{2+}-NTA was 99.7±4.5 mg/g (n=3). When the ratio of amount of enzyme to magnetic beads was 1∶15, the retention activity of the immobilized *Mt*PDF was (107.2±13.9)% (n=3) of the free enzyme, and decreased to 43% after 3 h under shaking at 0 ℃ and pH value of 7.5. By contrast, the immobilization capacity of *Mt*PDF-carboxy was 36.9±2.6 mg/g (n=3), and the retention activity of the immobilized *Mt*PDF reached to (102.6±15.4)% (n=3) when the ratio of amount of enzyme to magnetic beads was 1∶60, consistent with that on the Ni^{2+}-NTA magnetic beads, with negligible changes within 8 h under shaking at 0 ℃ and pH 7.5. The response of *Mt*PDF-carboxy to the inhibition of actinonin had no significant difference from that of free *Mt*PDF (P>0.05). **Conclusion** *Mt*PDF-carboxy magnetic beads present stable retention activity, and has similar inhibitory response as that of free *Mt*PDF, and thus is more suitable for screening of mixture library to discover high affinity ligands for *Mt*PDF.

[**Key words**] magnetic beads immobilization; peptide deformylase; tuberculosis; screening

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31570862, 81773625). Corresponding author: YANG Xiaolan, E-mail: xiaolanyang666@yeah.net

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病。据世界卫生组织发布的全球结核病报告,2019 年全球有约 1 000 万人罹患结核病[1]。目前临床的抗结核治疗药物主要有异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇等。这些药物的长期使用易产生肝肾毒副作用,且多重耐药和广泛耐药菌株的出现使结核病的治疗面临挑战[2]。

在原核细胞内核糖体介导的蛋白质合成过程中,需经甲硫氨酰 tRNA 合成酶的作用生成甲硫氨酰 tRNA,然后在甲硫氨酰 tRNA 甲酰基转移酶的作用下生成 N-甲酰化甲硫氨酸 tRNA,作为多肽链合成的 N-端起始氨基酸。肽脱甲酰基酶(peptide deformylase, PDF)由 def 基因(GeneBank: Rv0429c)编码,负责翻译完成后多肽链 N-端甲硫氨酸的甲酰基水解,使肽链完成进一步折叠[3]。PDF 广泛分布于原核生物细胞中,PDF 的突变或缺失导致细菌生长和繁殖受阻。因此,PDF 是细菌蛋白质合成过程中的关键酶,其抑制剂已广泛用于抗菌剂[4]。PDF 不存在于真核细胞质和酵母,但在人体多种肿瘤细胞中过表达。抑制或下调 PDF,可阻碍肿瘤细胞生长。因此,PDF 也成为抗肿瘤的靶点[5]。在人类细胞线粒体中也发现了 PDF[6],但研究证明 PDF 抑制剂对人体细胞的毒性较小[5]。结核分枝杆菌 PDF(*Mycobacterium tuberculosis* peptide deformylase, *Mt*PDF)抑制剂可阻止致病菌的生长,*Mt*PDF 作为抗结核分枝杆菌潜在靶点,可用于开发抗耐药结核分枝杆菌的药物[7-9]。

磁珠易于快速分离。表面官能团化磁珠通过共价、螯合或吸附固定生物活性分子而功能化,广泛应用于生物传感、疾病治疗、药物蛋白结合研究等生物医学领域[10-11],具有准确、高效、重现性好、便于自动化等优点。为实现复杂混合物库中高亲和力配体的快速筛选,本课题组建立了磁珠固定靶蛋白基于亲和力的选择性迭代指数富集技术(Affinity Driven Exponential Enrichment, ADEE)[12-13]。其实际应用需要亲水磁珠固定化靶蛋白,并保留足够高的活性和稳定性,对小分子的非特异结合低。本研究选用表面修饰偶极离子的亲水性亚微米磁珠,已证明对 Log P 小于 4.0 的小分子非特异结合较低[14],且其表面有延伸出来的可反应官能团,如氨基、羧基、巯基或 Ni^{2+}-NTA (Ni^{2+}-Nitrilotriacetic Acid)[15-16];以 *Mt*PDF 为靶,与该类表面修饰偶极离子且带羧基或 Ni^{2+}-NTA 的亲水磁珠偶联并表征其固定化容量、保留活性及稳定性,以期获得适用于 ADEE 筛选 *Mt*PDF 抑制剂的固定化靶蛋白。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Ni^{2+}-NTA 磁珠(批号 20170714,100 g/L)、羧基磁珠 F1(批号 20171121,30g/L)购于重庆博蓝鹰生物技术有限公司;质粒 pET-28a(+)购于中美泰和生物技术(北京)有限公司;感受态细胞 BL21(DE3)、硫酸卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、曲拉通 X-100、水

https://www.yixuebook.com/Chemotherapy/Tuberculosis/1004.html

唑、2-吗啉乙磺酸(2-Morpholinoethanesulfonic acid,MES)等购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;磷酸二氢钠购于重庆泽恒生物科技有限公司;4-羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid,HEPES)购于北京索莱宝科技有限公司;荧光胺购于阿法埃莎(中国)化学有限公司;Actinonin、过氧化氢酶(Catalase)购于Sigma-Aldrich;镍离子螯合亲和层析介质购于美国通用电器公司(GE Healthcare);甲酰-甲硫氨酸-丙氨酸-丝氨酸(formylate-Methionine-Alanine-Serine,fMAS)购于瑞士Bachem公司;N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxy succinimide,NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride,EDC]购于东京化成工业株式会社。

1.2 *实验方法*

1.2.1 *Mt*PDF重组表达与纯化 参照文献[17]进行*Mt*PDF的表达与纯化。将带有6×His标签的*Mt*PDF的质粒pET-28a(+):def转入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3),在含有100 μg/mL的硫酸卡那霉素的LB中37 ℃培养至菌液光密度*D*(600)=0.6~0.8。加入1 mmol/L IPTG于16 ℃诱导表达20 h。收集细胞菌体于重悬液(50 mmol/L磷酸二氢钠,1%曲拉通X-100和10 μg/mL Catalase,pH=7.5)进行超声破碎。于4 ℃、12 000 r/min离心15 min,上清用镍离子螯合亲和层析柱纯化。用含30 mmol/L咪唑洗杂缓冲液(50 mmol/L磷酸二氢钠,300 mmol/L氯化钠,pH=8.0)以700 μL/min流速洗杂蛋白。再用含300 mmol/L咪唑洗脱缓冲(50 mmol/L磷酸二氢钠,300 mmol/L氯化钠,pH=8.0)以300 μL/min流速洗脱目的蛋白*Mt*PDF。最后经浓缩透析缓冲液(50 mmol/L磷酸二氢钠,pH=8.0)浓缩处理后加入30%甘油储存于-80 ℃。

1.2.2 *Mt*PDF的活性测定及条件优化 参照文献[17]采用终点法测定*Mt*PDF活性:*Mt*PDF水解fMAS的N端甲酰基,生成的游离氨基与荧光胺在温和条件下反应所得产物可产生高强度的荧光,相对于不加酶的空白对照,荧光值的改变表征酶的活性。在150 μL含0.7 mol/L氯化钾、80 mmol/L HEPES(pH=7.5)缓冲液中加入25 ng *Mt*PDF与终浓度2 mmol/L fMAS,37 ℃孵育30 min后加入50 μL荧光胺(0.2 g/L 1,4-二氧噁烷溶液),再于37 ℃避光孵育5 min。使用Cary Eclipse荧光分光光度计检测荧光值,激发波长390 nm,发射波长480 nm,激发狭缝和发射狭缝均为10 nm,扫描速度为600 nm/min。进一步考察pH(4.0~8.0的磷酸盐缓冲液)、酶浓度、底物浓度(0.3~2.5 mmol/L)对活性测定的影响。

1.2.3 酶对抑制剂的响应 选取*Mt*PDF的纳摩尔级抑制剂Actinonin和微摩尔级抑制剂Calpeptin进行半抑制浓度(50% inhibitory concentration,IC_{50})测定[18]。称取2 mg的抑制剂用甲醇配成10 mmol/L的储备液。测定活性时,预先将一定终浓度抑制剂(控制甲醇终浓度<1%)与*Mt*PDF孵育5 min,再按照酶活测定体系与fMAS孵育30 min,再加入荧光胺孵育5 min检测荧光值,并计算酶活抑制率与抑制剂浓度的响应曲线,Origin 8.5拟合计算IC_{50}。抑制剂对酶的抑制率按公式计算:抑制率=$(F_0-F)/(F_0-F_{空白})\times100\%$,其中$F_0$为不加抑制剂时在25 ng *Mt*PDF作用下所测的荧光值,F为25 ng *Mt*PDF与一定浓度抑制剂存在时所测的荧光值,$F_{空白}$为不加酶的空白对照荧光值。

1.2.4 Ni^{2+}-NTA磁珠固定*Mt*PDF及表征 将100 g/L Ni^{2+}-NTA磁珠原液(含20 mmol/L磷酸钠水溶液,0.09%叠氮钠,0.1%抗氧化剂)振荡混匀后,取150 μg磁珠磁分离3 min去除上清液,用20 mmol/L Tris-HCl(pH=7.0)缓冲液洗涤3次。随后用20 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)缓冲液重悬为15 g/L。取不同量的*Mt*PDF(5、10、20、30、40、50、60 μg)于20 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)制成酶液。振荡状态下将磁珠悬液缓慢地加入酶液中,于0 ℃固定30 min。磁分离收集上清,并洗涤磁珠,磁珠洗涤后用含0.09%叠氮钠的酶缓冲液保存备用。合并洗涤液和上清液后使用Bradford法测定上清剩余蛋白量[19],蛋白加入量与上清剩余蛋白量之差为Ni^{2+}-NTA磁珠所固定*Mt*PDF的蛋白量并计算固定化容量。

固定化容量=(蛋白加入量-上清剩余蛋白量)/磁珠质量

Ni^{2+}-NTA磁珠固定*Mt*PDF酶活表征:固定化*Mt*PDF依次用20 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)和酶反应缓冲液HEPES洗涤后,加入酶反应缓冲液HEPES,控制磁珠浓度为1 g/L。按固定化酶量取等量游离酶平行操作,测定二者酶活,并比较、评估Ni^{2+}-NTA磁珠固定*Mt*PDF的保留活性比;加入不同浓度抑制剂Actinonin预孵育,再加入底物测定酶活,与游离酶比较。

Articles published in this journal are licensed under Creative Commons Attribution 4.0

取等量 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化酶和游离酶于 pH=7.5 的酶反应缓冲液 HEPES 中,0 ℃下振摇,连续 8 h 跟踪固定化酶和游离酶酶活改变,表征酶活稳定性。

1.2.5 羧基磁珠固定 *Mt*PDF 及表征 将 30 g/L 羧基磁珠原液(含 20 mmol/L 磷酸钠水溶液,0.09% 叠氮钠,0.1%抗氧化剂)振荡混匀后,取 600 μg 磁珠磁分离 3 min 去除上清液,用 20 mmol/L MES(pH=6.0)缓冲液洗涤 3 次,加入活化剂 75 mmol/L 的 NHS 和 EDC(pH=6.0 MES 缓冲液配置)各 50 μL,在摇床上于 25 ℃ 持续混合 30 min。用 20 mmol/L MES(pH=7.0)缓冲液洗涤 3 次,并重悬为 20 g/L。取不同量的 *Mt*PDF(5、10、20、30、40、50、60 μg)于 20 mmol/L MES(pH=7.0)制成酶液。振荡状态下将磁珠悬液缓慢地加入酶液中,于 0 ℃ 固定 30 min。磁分离收集上清,并洗涤磁珠,合并洗涤液和上清液同 1.2.4 测定固定化蛋白量并计算固定化容量。磁珠用 50 mmol/L 甘氨酸 50 μL 处理 30 min,将磁珠再次洗涤后用含 0.09% 叠氮钠的酶缓冲液保存备用。

羧基磁珠固定化 *Mt*PDF 酶活表征:固定化 *Mt*PDF 用酶反应缓冲液 HEPES 洗涤 3 次,同 1.2.4 测定酶活和稳定性,并与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化酶比较保留活性比和稳定性。

1.3 统计学分析

实验均重复 3 次,使用软件 Origin 8.5 处理数据,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS.20 统计软件比较磁珠固定化 *Mt*PDF 与游离酶对 Actinonin 的 IC_{50} 差异,经配对样本 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

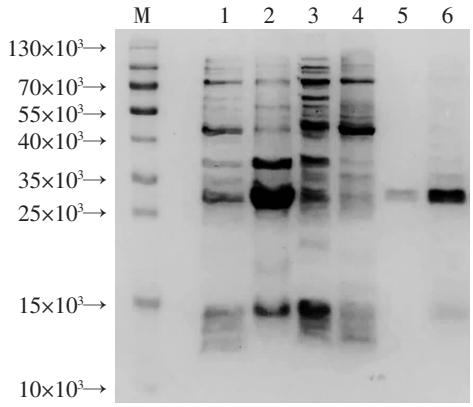
2 结果

2.1 *Mt*PDF 的表达和纯化

委托公司构建 *Mt*PDF 的质粒 pET-28a(+),N 端带有 6×His 亲和标签及凝血酶识别和切割位点。经测序比对,与 GenBank 中结核分枝杆菌 H37Rv 的碱基序列 Rv0429c 一致,其编码的氨基酸序列与 *Mt*PDF(PDB ID:3E3U)的氨基酸序列一致。将质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达。经镍离子螯合亲和层析柱纯化,用 300 mmol/L 咪唑洗脱可得 *Mt*PDF(图 1)。SDS-PAGE 检测可见 29×10^3 处目的蛋白条带,纯度较高,满足固定化要求。通过 Bradford 方法测定蛋白浓度计算纯化所得蛋白产量约为 6.7 mg/L 的 LB 培养基。因 *Mt*PDF 的溶解度较低,大部分目的蛋白存在于沉淀中。

2.2 *Mt*PDF 活性测定及条件优化

*Mt*PDF 水解底物 fMAS 生成三肽含有游离氨基,其与荧光胺作用生成的产物导致荧光增强。因此,利用终点法测定荧光值的改变表示酶活。以不加酶的反应体系为空白对照组(图 2A)。酶活即为 *Mt*PDF 存在下(图 2A 组分 5)荧光值减去空白对照(图 2A 组分 4)荧光值。随着酶用量增加,所测的荧光值也随之增加,并且在一定范围内(5~25 ng)呈现出良好的线性(图 2B)。酶的最适 pH 在 7.5 左右(图 2C),在 pH=7.0 和 pH=8.0 时酶活降低约 30%,在 pH=4.0~5.0 时活性基本丧失。因此,酶活测定用 pH=7.5 的缓冲液。利用双倒数作图法测定 fMAS 的米氏常数 K_m=1.85 mmol/L(图 2D)。



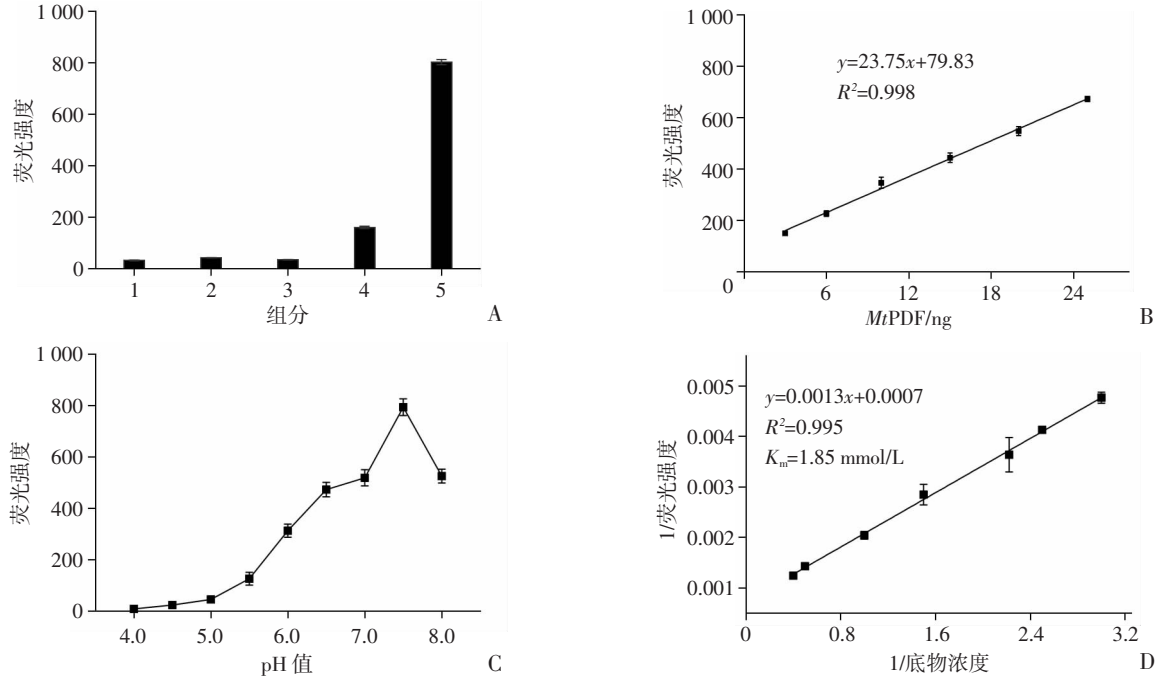
M:标准;1:裂解液;2:沉淀;3:上清液;4:30 mmol/L 咪唑洗杂蛋白;5:300 mmol/L 咪唑洗目的蛋白;6:浓缩透析液

图 1 6×His-*Mt*PDF 的表达与纯化

2.3 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化

Ni^{2+}-NTA 磁珠用量为 150 μg,加入不同量的 *Mt*PDF 进行固定化。根据响应曲线(图 3),在 *Mt*PDF 加入量约 30 μg 时,酶固定化量达饱和,即 15 μg 左右,因此饱和固定化容量为(99.7±4.5) mg/g(n=3)。但固定化酶用量为 10 μg,即酶量∶磁珠量=1∶15 时,固定化酶活性相对于游离酶活的比值已达峰值,为(107.2±13.9)%(n=3);此后随着酶固载量增加,活性并无明显增高,可能与固载酶量增加,酶的活性位点空间位阻增加有关。

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



A:不同组分的荧光强度;组分 1:HEPES;组分 2:HEPES+*Mt*PDF+荧光胺;组分 3:HEPES+fMAS+*Mt*PDF;组分 4:HEPES+fMAS+荧光胺;组分 5:HEPES+fMAS+*Mt*PDF+荧光胺;B:不同量 *Mt*PDF 与荧光强度的线性关系;C:*Mt*PDF 的 pH 效应;D:fMAS 的米氏常数

图 2 *Mt*PDF 的活性测定

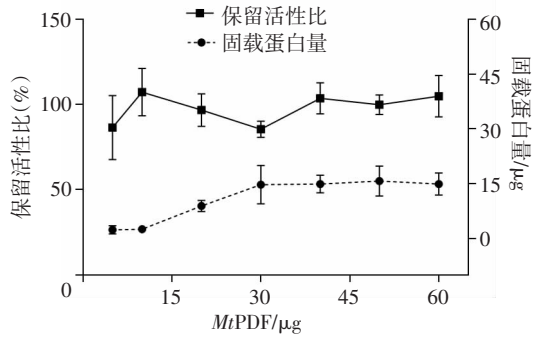


图 3 *Mt*PDF 与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化的固载蛋白量和保留活性比

2.4 羧基磁珠固定化

羧基磁珠用量 600 μg,加入不同量 *Mt*PDF 进行固定化。酶固定化量增至 22 μg 左右达到饱和,此时对应的酶加入量约 50 μg,由此计算羧基磁珠对酶的固定化容量为(36.9±2.6) mg/g (n=3)。当固定化酶用量为 10 μg,酶量∶磁珠量=1∶60,固定化酶活性相对于游离酶活的比值最高,为(102.6±15.4)% (n=3,图 4),与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化最高保留活性相当;但与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化不同的是,继续增加酶用量,保留活性反而逐渐降低,当固定化酶用量增加至 60 μg,保留仅 9%。活化羧基直接偶联蛋白氨基,比 Ni^{2+}-NTA 对蛋白标签的固定化,生成的偶联产物空间位阻更大,导致随固载量增大,活性反而降低。

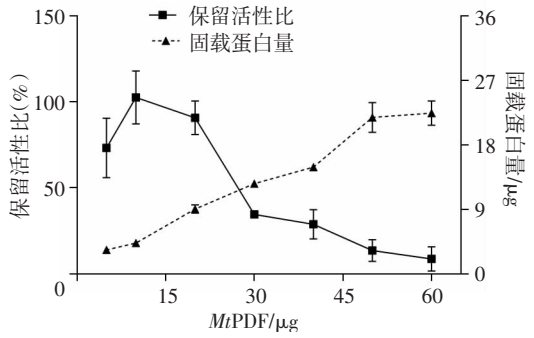
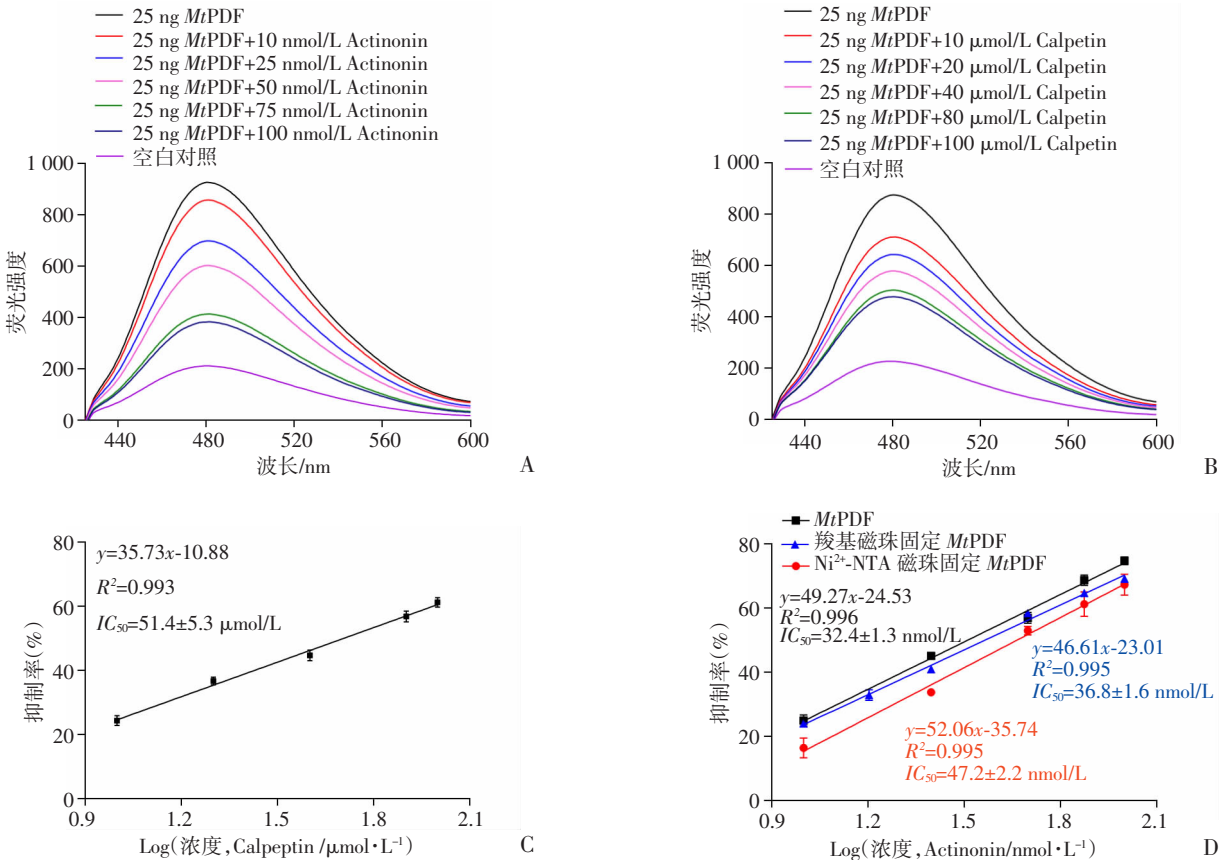


图 4 *Mt*PDF 与 F1 羧基磁珠固定化的固载蛋白量和保留活性比

2.5 游离酶与固定化酶对抑制剂的响应

经酶反应混合物的荧光扫描(图 5A、B)可见,随着抑制剂浓度增加,游离酶反应对应的荧光值降低。游离酶对 Calpeptin 抑制率 IC_{50} 为(51.4±5.3) μmol/L (n=3,图 5C),对 Actinonin 抑制率 IC_{50} 为(32.4±1.3) nmol/L (n=3)。Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化酶对 Actinonin 抑制率 IC_{50} 为(47.2±2.2) nmol/L(n=3),与游离酶接近,但差异有统计学意义(P=0.004)。而羧基磁珠固定化酶对 Actinonin 抑制率 IC_{50} 为(36.8±1.6) nmol/L(n=3,图 5D),与游离酶差异无统计学意义(P=0.114)。

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



A:游离酶对0~100 nmol/L Actinonin的荧光强度响应;B:游离酶对0~100 μmol/L Calpeptin的荧光强度响应;C:游离酶对Calpeptin的IC_{50};D:游离酶与固定化酶对Actinonin的IC_{50}

图5 游离酶与磁珠固定化酶对抑制剂的响应

2.6 游离酶与固定化酶的稳定性

在0 ℃、pH=7.5的HEPES酶反应缓冲液中分散振摇,游离*Mt*PDF在2 h内活性较稳定,3 h后活性下降了17%;Ni^{2+}-NTA磁珠固定*Mt*PDF的活性1 h内稳定,3 h活性仅为43%;羧基磁珠固定*Mt*PDF 8 h内活性未见明显改变(图6),羧基磁珠固定*Mt*PDF稳定性满足固定化后筛选对稳定性的要求。

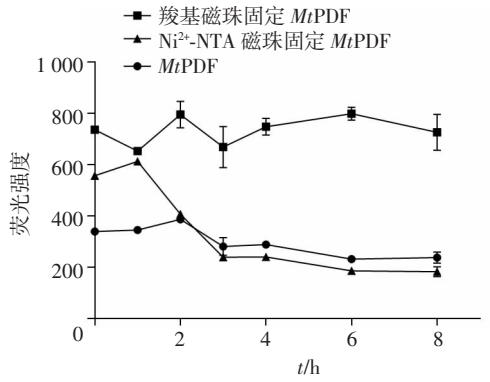


图6 游离酶与磁珠固定化酶的稳定性

3 讨论

天然产物混合物成分复杂、含量差异大,使其活性成分筛选面临巨大挑战。天然产物筛选传统方法依赖于活性跟踪的分离、纯化、结构鉴定和活性确定,过程复杂、费力、成本高,且通常作用的靶不明确[20]。现有筛选方法主要基于配体-药靶结合再分离后结构分析,包括平衡透析、微透析、超滤、亲和色谱和固定化靶的配体捕获等分离技术联合HPLC-MS分析的在线和离线模式分析[21]。基于目标蛋白固定化的配体捕获技术已广泛应用于天然产物的活性成分筛选。ZHANG等[22]利用固定化人血清白蛋白的表面等离子体共振生物传感器偶联UPLC-QTOF/MS在线模式筛选中药黄芪的活性成分。LIU等[23-24]用磁珠固定牛血清白蛋白捕获配体联合HPLC-MS/MS离线模式筛选枳壳的乙酸乙酯提取物和黄芪的正丁醇提取物中活性成分。这些技术虽然提高了效率及灵敏度,但无法对混合物中极微量的活性成分进行富集测定,且难以同步

https://www.chinajournal.net.cn

测定亲和力。本课题组建立的基于两性亲水磁珠固定化靶蛋白的 ADEE 技术,有望用于富集和筛选复杂混合物中的微量活性成分,并同步测定亲和力。

由链霉菌属产生的 Actinonin 在体外对多种细菌来源包括结核分枝杆菌 PDF 有良好的抑制作用,但在体内生物利用度低且不具有特异性,而未被进一步开发[25]。Vicuron 公司开发的 LBM-415 与 British Biotech 和 GeneSoft 开发的 BB-83698 进入了临床Ⅰ期试验;由 GlaxoSmith-Kline 开发的 PDF 抑制剂 GSK1322322 成功完成了急性细菌性皮肤感染的临床Ⅱ期试验[18]。因此,将 *Mt*PDF 作为开发新型抗结核药物靶点具有重要意义。所有原核生物及真核生物中的 PDFs 的蛋白质氨基酸序列的同源性为 20%~30%,但参与活性位点的三个基序高度保守。其中,基序 3 [HEΦΦH](Φ 代表任意疏水氨基酸)中的两个组氨酸和基序 2 [EGCLS] 中的半胱氨酸与酶的金属离子螯合形成活性四面体[26]。当 Actinonin 存在时,其羟基肟酸-C(=O)NH(OH) 基团与金属离子发生螯合作用从而抑制酶活[27]。本研究将构建的 N 端带有 6×His 标签 *Mt*PDF 的质粒 pET-28a(+):def,经 *E. coli* BL21(DE3)重组表达并纯化获得 *Mt*PDF。纯化后所得目的蛋白相对分子质量约为 29×10^3,比理论相对分子质量(约 22×10^3)高约 7×10^3,与其所含较多脯氨酸导致的电泳异常迁移相关[9],纯度满足固定化要求。Ni^{2+}-NTA 磁珠通过与 *Mt*PDF 的 6×His 标签螯合而位点选择性固定化 *Mt*PDF;羧基磁珠经活化的羧基与酶蛋白的赖氨酸残基的氨基反应形成酰胺键而共价结合。*Mt*PDF 仅有 Lys 120、171、175 三个赖氨酸残基,均位于蛋白表面,易于与羧基磁珠以酰胺键偶联;且由于这三个赖氨酸残基远离活性中心,理论上羧基磁珠固定化对 *Mt*PDF 酶活无显著影响。但羧基磁珠固定化与 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化相比,其生成的偶联靶蛋白空间位阻更大,导致固载量过高时酶活性降低。故在羧基磁珠固定化时,需优化投料比,以达到最高保留活性的最小蛋白投料量。在蛋白与磁珠最优投料比固定时,羧基磁珠固定化 *Mt*PDF 在最适 pH=7.5 的缓冲液中振摇超过 8 h 活性几乎不变,但 Ni^{2+}-NTA 磁珠固定化 *Mt*PDF 2 h 后活性开始下降。这可能是 Ni^{2+}-NTA 磁珠螯合 6×His 复合物对 pH 较敏感所致。

因此,*Mt*PDF 与活化后的羧基磁珠通过酰胺键共价结合,相对于 Ni^{2+}-NTA 磁珠螯合固定化,最高保留活性比相当但稳定性更强,固定化前后对 Actinonin 的 IC_{50} 也无显著性差异,可用于 *Mt*PDF 混合物中高亲和力配体筛选。ADEE 的广泛应用依赖于酶的大量可溶表达和固定化。*Mt*PDF 的可溶表达及纯化产率较低,可能与其溶解度低有关。后期进一步提高 *Mt*PDF 的可溶表达和纯化产率,可望用于中药等混合物中活性先导化合物发现。本课题组正实施 *sj*GST(Schistosoma japonicum Glutathione S-transferase)作为融合标签以期促进 *Mt*PDF 的可溶性表达和纯化,有望提高产率。

参考文献:

[1] WHO. Global tuberculosis report 2020[M]. Geneva: World Health Organization, 2020.

[2] CONRADIE F, DIACON A H, NGUBANE N, *et al*. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis[J]. N Engl J Med, 2020, 382(10): 893-902. DOI:10.1056/nejmoa1901814.

[3] JAROCKI V M, STEELE J R, WIDJAJA M, *et al*. Formylated N-terminal methionine is absent from the Mycoplasma hyopneumoniae proteome: Implications for translation initiation [J]. Int J Med Microbiol, 2019, 309(5): 288-298. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.03.005.

[4] KOZSUP M, KEOGAN D M, FITZGERALD-HUGHES D, *et al*. Synthesis and characterisation of Co(III) complexes of N-formyl hydroxylamines and antibacterial activity of a Co(III) peptide deformylase inhibitor complex[J]. Dalton Trans, 2020, 49(21): 6980-6988. DOI: 10.1039/d0dt01123a.

[5] HU L, CAI X, DONG S Z, *et al*. Synthesis and anticancer activity of novel actinonin derivatives as HsPDF inhibitors [J]. J Med Chem, 2020, 63(13): 6959-6978. DOI:10.1021/acs.jmedchem.0c00079.

[6] ESCOBAR-ALVAREZ S, GARDNER J, SHETH A, *et al*. Inhibition of human peptide deformylase disrupts mitochondrial function[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(21): 5099-5109. DOI:10.1128/MCB.00469-10.

[7] GOKHALE K M, TELVEKAR V N. Novel peptidomimetic peptide deformylase (PDF) inhibitors of Mycobacterium tuberculosis[J]. Chem Biol Drug Des, 2020: cbdd.13769. DOI:10.1111/cbdd.13769.

[8] BATTAH B, CHEMI G, BUTINI S, *et al*. A repurposing approach for uncovering the anti-tubercular activity of FDA-approved drugs with potential multi-targeting profiles[J]. Molecules, 2019, 24(23): 4373. DOI:10.3390/molecules24234373.

[9] NARAYANAN S S, SOKKAR P, RAMACHANDRAN M, *et al*. Glycine in the conserved motif III modulates the thermostability and oxidative stress resistance of peptide deformylase in Mycobacterium tuberculosis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 320(1): 40-47. DOI:10.1111/j.1574-6968.2011.02289.x.

[10] IRANMANESH M, HULLIGER J. Magnetic separation: its application in mining, waste purification, medicine, bio-

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

chemistry and chemistry[J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(19): 5925-5934. DOI:10.1039/c7cs00230k.

[11] YANG Q, DONG Y, QIU Y, *et al*. Design of functional magnetic nanocomposites for bioseparation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 191: 111014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111014.

[12] YANG X L, XIE Y, PU J, *et al*. Estimation of affinities of ligands in mixtures via magnetic recovery of target-ligand complexes and chromatographic analyses: chemometrics and an experimental model[J]. BMC Biotechnol, 2011, 11(1): 44. DOI: 10.1186/1472-6750-11-44.

[13] YANG X L, PU J, ZHAO H, *et al*. Method to screen aromatic ligands in mixtures for quantitative affinities to target using magnetic separation of bound ligands along with HPLC and UV photometry detection[J]. Microchimica Acta, 2012, 176(1/2): 243-249. DOI: 10.1007/s00604-011-0696-y.

[14] YANG X L, HU X L, CHEN C Y, *et al*. Comparison of the immobilization of 6His-tagged proteins on magnetic-submicron-particle functionalized with Ni^{2+}-NTA and bis-sulfone[J]. Nanosci Nanotechnol Lett, 2015, 7(6): 486-494. DOI: 10.1166/nnl.2015.1996.

[15] RAO J J, LIAO J, BU Y, *et al*. Ampholytic Ion-exchange materials coated with small zwitterions for high-efficacy purification of ionizable soluble biomacromolecules[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120(pt B): 2234-2241. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.020.

[16] XIE Y L, CHONG H M, LI Y P, *et al*. Facile comparison of nonspecific adsorptions of proteins on magnetic submicron particles with alkaline phosphatases as the probes[J]. Nanosci Nanotechnol Lett, 2019, 11(11): 1574-1581. DOI: 10.1166/nnl.2019.3048.

[17] TEO J W, THAYALAN P, BEER D, *et al*. Peptide deformylase inhibitors as potent antimycobacterial agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3665-3673. DOI: 10.1128/aac.00555-06.

[18] SANGSHETTI J N, KHAN F A, SHINDE D B. Peptide deformylase: a new target in antibacterial, antimalarial and anticancer drug discovery[J]. Curr Med Chem, 2015, 22(2): 214-236. DOI: 10.2174/0929867321666140826115734.

[19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[20] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present, and future[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2016, 43(2/3): 155-176. DOI: 10.1007/s10295-015-1723-5.

[21] FU Y, LUO J, QIN J, *et al*. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 168: 189-200. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.02.027.

[22] ZHANG Y, SHI S, GUO J, *et al*. On-line surface plasmon resonance-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of human serum albumin binders from Radix Astragali[J]. J Chromatogr A, 2013, 1293: 92-99. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.015.

[23] LIU Q, SHI S, LIU L, *et al*. Separation and purification of bovine serum albumin binders from Fructus polygoni orientalis using off-line two-dimensional complexation high-speed counter-current chromatography target-guided by ligand fishing[J]. J Chromatogr A, 2013, 1304: 183-193. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.043.

[24] LIU L L, LENG J, YANG X A, *et al*. Rapid screening and identification of BSA bound ligands from Radix astragali using BSA immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC-MS[J]. Molecules, 2016, 21(11): 1471. DOI: 10.3390/molecules21111471.

[25] FIEULAINE S, ALVES DE SOUSA R, MAIGRE L, *et al*. A unique peptide deformylase platform to rationally design and challenge novel active compounds[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 35429. DOI: 10.1038/srep35429.

[26] GIGLIONE C, FIEULAINE S, MEINNEL T. N-terminal protein modifications: Bringing back into play the ribosome[J]. Biochimie, 2015, 114: 134-146. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.11.008.

[27] ŽALUBOVSKIS R, WINUM J Y. Inhibitors of selected bacterial metalloenzymes[J]. Curr Med Chem, 2019, 26(15): 2690-2714. DOI: 10.2174/0929867325666180403154018.

(收稿:2020-10-05;修回:2020-12-10)

(编辑 汪勤俭)

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/