

(Department of Biochemistry, Qingdao Medical College, Qingdao 266021, China; ¹⁾ Department of Physics, Qingdao Medical College, Qingdao 266021, China).

Abstract The change of conformation and activity of human placental alkaline phosphatase (PLAP, E. C. 3. 1. 3. 1) in pentachlorophenol (PCP) solutions of different concentrations were studied by enzymic activity measurement and fluorescence spectra. The inhibition type of PLAP by PCP and the effect of pH on the enzyme inhibition were simultaneously measured. In the PCP concentrations lower than 1.0 mmol/L, the enzyme activity and fluorescence intensity rapidly decreases with a marked red shift of emission maximum. In the PCP concentrations higher than 1.0 mmol/L, the enzyme activity and fluores-

cence intensity gradually decreases with a continuous red shift of emission maximum. At 5.0 mmol/L PCP, the enzyme intrinsic fluorescence quenched and the enzyme activity is 51.4% of original activity. At 10.0 mmol/L PCP, the enzyme residual activity is 30.0%. PCP is an uncompetitive inhibitor of PLAP. The inhibition constant (K_i) is 3.86 mmol/L. The activity inhibition of PLAP also affected by the pH, its activity inhibition disappeared below pH 7.5, but gradually increasing between pH 7.5~ 10.5. The results suggest that the activity inhibition and the conformation changes of the enzyme were caused by PCP. The inhibition of PLAP activity correlates with the dissociation state of PCP.

Key words pentachlorophenol, alkaline phosphatase, fluorescence spectra, activity, inhibition

固定化金属螯合亲和膜纯化重组抗菌肽研究*

魏琪 姚汝华

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

鲍时翔

(中国热带农业科学院生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要 用自行制备的固定化金属螯合亲和膜对 N 端含六个组氨酸标记的重组抗菌肽进行了分离纯化, 并较好地解决了金属离子泄露问题. 实验表明, 固定化金属螯合亲和膜性能优于传统琼脂糖凝胶介质, 完全适用于分离纯化含有多组氨酸标记的重组蛋白质.

关键词 亲和层析, 亲和膜, 抗菌肽

学科分类号 Q814

固定化金属螯合亲和层析 (immobilized metal-chelated affinity chromatography, IMAC) 是一种新兴的亲亲和色谱技术, 其原理是利用 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等过渡金属离子与蛋白质表面的组氨酸、色氨酸或半胱氨酸配位结合, 由于蛋白质表面这些氨基酸的种类、数量、位置和空间构象不同, 因而与金属螯合物的亲和力大小不同, 从而可选择性地加以分离纯化^[1]. 基因工程的发展极大地促进了 IMAC 技术的应用^[2]; 利用基因工程技术在目标重组蛋白质的末端接上一亲和多肽链, 以提高其结合力及分辨率, 然后用酶或化学方法将融合的多肽链切除并与目标蛋白质分离, 从而得以纯化. 传统的 IMAC 固定相多为偶联有亚氨基二乙酸的软性或半刚性琼脂糖凝胶或硅基介质. 近年来, 人

们结合亲和和色谱特异性高和膜技术分离快、处理量大的优点, 研制成功了亲和膜^[3,4].

抗菌肽类物质是 70 年代研究昆虫免疫系统时发现的一类具有抗菌特性的小分子多肽^[5]. 昆虫抗菌肽具有分子小、热稳定、水溶性好、杀菌力强、抗菌谱广等优点, 对细菌、真菌、昆虫及某些病毒、肿瘤细胞均有明显的杀伤作用, 而对正常真核细胞无伤害作用^[6,7], 所以抗菌肽的发现与利用将为人类与各种病原菌的斗争提供一个有利的武器. 由于对抗菌肽结构与功能及杀伤机理的研究进展, 新型高效、广谱低毒抗菌肽已成为抗菌肽研究

* 国家自然科学基金资助项目 (29606004).

Tel: (020) 87113842, E-mail: weiqiscut@163.net

收稿日期: 1999-09-07, 修回日期: 1999-11-01

领域的重要方向^[8].

本文的目的是研制新型的固定化金属螯合亲和膜并用于分离纯化含有多组氨酸标记的重组抗菌肽.

1 材料与方法

1.1 材料

纤维素分析滤纸购自杭州新华造纸厂, 其他试剂均为国产分析纯化学试剂, 甲醇赤毕氏酵母表达系统购自美国 Invitrogen 公司, BioCAD 色谱工作站购自美国 PE 公司.

1.2 方法

1.2.1 固定化金属螯合亲和膜制备: 将 30 张纤维素分析滤纸放入 5 mol/L NaOH 溶液, 60 °C 碱处理 30 min 后, 加入 5 mol/L NaOH、二甲亚砜、环氧氯丙烷混合液 (2: 4: 5) 90 ml, 60 °C 活化 4 h; 放入 100 ml 1.5 mol/L Na₂CO₃, 1 g 亚氨基二乙酸二钠, 60 °C 偶联反应 12 h 后浸入 50 mmol/L CuSO₄ 溶液 1 h, 即制得固定化金属螯合亲和膜. 环氧基密度测定用硫代硫酸钠法, 配基密度测定用凯氏定氮法, 金属离子密度测定用可见光吸收法测 Cu²⁺-EDTA 浓度 (A_{800}), 蛋白质浓度测定用紫外光吸收法 (A_{280}).

1.2.2 重组酵母构建及培养: 利用甲醇赤毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 表达体系对抗菌肽 Cecropin AD 基因进行改造、克隆、转化后获得重组菌株. 接种重组酵母于 YEPD 培养基, 30 °C 250 r/min 摇床培养 6 d, 1 2000 r/min 离心 10 min 取上清液; 经亲和膜纯化后, 做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 *E. coli* K₁₂D₃₁ 抑菌活性检测.

1.2.3 抗菌肽纯化: 先在膜柱底部放入一张未固定化 Cu²⁺ 的亲膜, 再装入 30 张亲和膜, 连入 BioCAD 色谱工作站, 经 pH 7.7 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液及 pH 4.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐-1 mol/L 氯化钠缓冲液彻底洗去未结合的 Cu²⁺ 后, 再用上述磷酸盐缓冲液平衡, 上样 10 ml 抗菌肽上清液, (开始计时) 用 pH 7.7 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液 (A) 淋洗 10 min, 再依次用 pH 5.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (B) 洗脱 15 min, pH 4.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐-1 mol/L 氯化钠缓冲液 (C) 洗脱 20 min, pH 4.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐-1 mol/L 氯化钠-0.10 mol/L 咪唑缓冲液 (D) 洗脱 15 min. 实验在室温下进行, 流速均为 1 ml/min. 纯化结果见图 1.

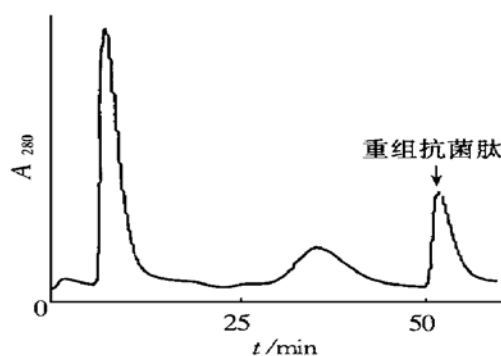


图 1 固定化金属螯合亲和膜纯化重组抗菌肽图

2 结果与讨论

通过环氧氯丙烷活化纤维素介质, 引入三碳链间隔臂及活性环氧基, 在糖链间产生化学交联, 大大强化了其松散的网状结构. 偶联过程中因亚氨基二乙酸二钠是金属螯合剂, 属通用性配基, 不象生物特异性配基 (如抗原、酶底物) 那样易失活性, 因此反应条件宽松, 方法简单; 虽然其特异性不如生物特异性配基高, 但通过优化洗脱条件, 也可获得满意的结果^[3,4]; 且普通纤维素滤纸价廉易得, 金属离子配基较之生物特异性配基具有明显的价格优势, 因此具有更广阔的开发应用前景.

在用固定化金属螯合亲和和层析分离纯化生物大分子时, 一个比较麻烦的问题是洗脱时少量 Cu²⁺ 会随生物大分子一起被洗脱下来, 造成目标产物的污染, 有关降低固定化金属螯合亲和膜金属离子泄露问题国内外还未见报道. 实验表明, 在使用前用平衡缓冲液及洗脱缓冲液彻底洗去未结合的 Cu²⁺ 及在膜柱底部放入一张未固定化 Cu²⁺ 的亲膜以接收可能被洗脱下来的 Cu²⁺, 可将 Cu²⁺ 的泄露量降至 0.086×10^{-6} g/ml, 而同样缓冲液条件下用购自瑞典 Pharmacia 公司的固定化金属螯合亲和和层析凝胶介质 (chelating sepharose fast flow) 洗脱时 Cu²⁺ 泄露量为 6×10^{-6} g/ml.

由图 1 可知, 亲和膜纯化抗菌肽的整个操作流程仅需 1 h 左右, 且通过优化洗脱过程还可压缩至 30 min 内, 而根据国外报道用琼脂糖凝胶介质纯化含多组氨酸标记的重组蛋白质需要数小时. 若有与膜盒配套的高效液相色谱设备, 理论上还可通过提高流速, 有望在数分钟内完成纯化.

甲醇赤毕氏酵母表达体系中的表达载体 PGAPZcA 属组成分泌表达型载体, 载体上的 zeocin 抗性基因作筛选标记, 多克隆位点后有抗原

决定基因片段和 6 个组氨酸标记的基因片段, 以利于产物检测与纯化。由于欲纯化的重组抗菌肽 N 端含有 6 个组氨酸残基, 因此与配基的结合力非常大, 需要在洗脱液加入竞争性洗脱剂咪唑才能将其洗脱下来。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示在 7.1 ku 处有一条带, 但含量较低, 与重组抗菌肽的理论分子质量相符, 经 *E. coli* K₁₂D₃₁ 抑菌活性检测证明为目标产物。末端多组氨酸标记的另一优点是分子质量较小, 对蛋白质的完整性及活性影响很小^[8], 因此纯化后无需切除。*E. coli* K₁₂D₃₁ 抑菌活性检测表明纯化后的抗菌肽活性比纯化前有较大提高。

由此可见, 固定化金属螯合亲和膜具有亲和层析特异性高及膜分离技术流量大、产率高的优点, 分离纯化含有多组氨酸标记重组蛋白质是固定化金属螯合亲和层析最有前景的应用之一, 即使痕量的标记蛋白只需经过 IMAC 一步就能将其从复杂的细胞裂解物中分离出来。因此固定化金属螯合亲和膜有望在大规模分离纯化基因工程及发酵工程产物中发挥重要作用。

致谢 感谢中国热带农业科学院热作生物技术国家重点实验室的郑学勤先生和陈偿先生提供重组酵母菌株。

参 考 文 献

- 1 Poroth J, Carlsson J, Olsson I, *et al.* Metal chelate affinity chromatography: a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, **258** (5536): 598~ 599
- 2 Beeskow T C, Kusharyoto K, Anspach F B, *et al.* Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. *J Chromatography A*, 1995, **715**: 49~ 65
- 3 Serfica G C, Pimbley J, Belfort G, *et al.* Protein fractionation using fast flow immobilized metal chelate affinity membranes. *J*

Membrane Science, 1994, **88**: 292~ 300

- 4 Reif O W, Volker N, Bahr U, *et al.* Immobilized metal affinity membrane adsorbers as stationary phases for metal interaction protein separation. *J Chromatography A*, 1993, **654**: 29~ 46
- 5 Boman H G, Fink J. Inducible antibacterial defence system in *drosophila*. *Nature*, 1972, **237** (5354): 232~ 235
- 6 Boman H G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 1991, **65** (2): 205~ 207
- 7 Craig A G, Trenczek T, Fries I, *et al.* Mass spectrometric identification of peptides present in immunized and parasitised hemolymph from honeybees without purification. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **165** (2): 637~ 643
- 8 Fink J, Boman A, Boman H G, *et al.* Design synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides. *Int J Peptide Protein Res*, 1989, **33**: 807~ 813

Separate Recombinant Antibacterial Peptide With Immobilized Metal-chelated Affinity Chromatography Membranes. WEI Qi, YAO Ru-Hua (*Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*); BAO Shi-Xiang (*Biotechnology National Key Laboratory, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China*).

Abstract Immobilized metal-chelated affinity chromatography (IMAC) membranes were prepared for separating a recombinant fusion antibacterial peptide, which carried a polyhistidine sequence (HIS₆ tag) at the N-terminus. Low bleeding of metal ion was achieved. It was proved that the properties of IMAC membranes were better than conventional chelating sepharose fast flow column. The fractionation of recombinant proteins that carry a polyhistidine tag is currently perhaps the most promising application of IMAC.

Key words affinity chromatography, affinity membrane, antibacterial peptide

R-PIA 保护心肌影响钾通道和一氧化氮的研究

柏 华 卢景芬¹⁾ 颜振瀛²⁾ 古力努尔 张 敏³⁾

(北京医科大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 就多种药物或措施改善心肌缺血/再灌注损伤的关键环节或信息通路进行了探讨。以大鼠心肌为材料, 选取腺苷 A₁ 受体激动剂 R-苯异丙基腺苷 (R-PIA) 为保护剂, 分别或同时加入 ATP 敏感性钾通道阻滞剂格列苯

¹⁾ 通讯联系人。 ²⁾ 首都医科大学宣武医院。 ³⁾ 北京医科大学病理生理学系。