

酰乙基苯丙氨酸型镍树脂 在纯化融合蛋白中的应用

张晓晓, 许琳, 魏荣卿, 沈珺, 刘晓宁

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京 210009)

摘要: 将聚苯乙烯作为载体, 以氯乙酰化代替氯甲基化, 制备了聚苯乙烯酰乙基苯丙氨酸-Ni²⁺树脂(PS-Phe-Ni²⁺)。该树脂合成方法简单, 过程中不使用致癌物氯甲醚等; 羰基乙酰基可与苯丙氨酸上的氧与 Ni²⁺形成 2 个五元环, 使该树脂对 Ni²⁺的螯合稳定且螯合量较高, 有利于提高蛋白吸附量。以醛糖还原酶融合蛋白为对象, 初步考察了该树脂在纯化融合蛋白中的应用。在合适的条件下纯化倍数可达 30 倍。

关键词: 聚苯乙烯; 聚苯乙烯酰乙基苯丙氨酸-Ni²⁺树脂; 醛糖还原酶融合蛋白; 纯化

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)05-0057-03

Application of acetyl phenylalanine-Ni²⁺ resin in purification of fusion protein

ZHANG Xiao-xiao, XU Lin, WEI Rong-qing, SHEN Jun, LIU Xiao-ning

(College of Life Science and pharmaceutical engineering, Nanjing University of technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: A polystyrene acetyl phenylalanine-Ni²⁺ resin (PS-Phe-Ni²⁺) is prepared by chloroacetylated polystyrene instead of chloromethyl polystyrene resin as the matrix. This process is simple and avoids carcinogenic compounds (such as chloromethyl ether, etc.). The carbonyl of PS-Acyl-Cl and oxygen atom of L-Phe can form two five-membered rings with Ni²⁺ to improve the adsorption capacity and stabilize the chelation of the resin for Ni²⁺, which is favorable for the adsorption capacity of protein. PS-Phe-Ni²⁺ is used to purify aldose reductase fusion protein, and under optimal conditions the protein can be purified up to 30 folds from the original.

Key words: polystyrene; polystyrene acetyl phenylalanine-Ni²⁺ resin; aldose reductase fusion protein; purify

酶催化法合成手性药物前景广阔^[1], 随着基因工程的发展, 大量的酶可以通过克隆表达获得, 而融合蛋白的纯化是酶催化法合成手性药物的前提。金属螯合亲和层析作为一种常用的蛋白纯化手段^[2], 在融合蛋白的纯化中广泛使用。常规的金属螯合亲和层析介质多以葡聚糖或琼脂糖等软基质作为载体, 但这些介质价格昂贵、配基的制备困难、偶联条件激烈, 且在制备时常使用溴化氰等剧毒试剂^[3-4]。而聚苯乙烯(PS)作为载体, 具有原料来源广泛、价廉且易功能化等优点^[5]。笔者将聚苯乙烯树脂作为载体, 用氯乙酰氯对其进行功能化反应, 制得了氯乙酰化聚苯乙烯(chloroacetylated polystyrene, PS-Acyl-Cl)^[6], 之后再引入苯丙氨酸(Phe)和镍离子, 制备了一种聚苯乙烯型金属螯合树脂(PS-Phe-Ni²⁺), 该合成方法简单并避免了在氯甲基化树脂制备过程中使用致癌物氯甲醚。另外由于羰基乙酰基可与苯丙氨酸

上的氧与 Ni²⁺形成 2 个五元环, 达到稳定螯合 Ni²⁺的目的。同时以醛糖还原酶融合蛋白为对象初步考察了该树脂在纯化融合蛋白中的应用。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

氯乙酰聚苯乙烯(PS-Acyl-Cl)微球, 交联度 7%, 粒径 150 μm, 南京麦科非高效分离载体有限公司; 标准蛋白分子质量 Marker, Ferment 公司; 三乙基苄基氯化铵(TEBA)、1,2-二氯乙烷(1,2-DCE)、氢氧化钠(NaOH)、硫酸镍、咪唑、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠等, 均为分析纯, 蛋白胨、酵母膏、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氯霉素、氨苄青霉素、L-苯丙氨酸(L-Phe)均为生化试剂; TU1901 型紫外/可见光光度计, 北京普析通用仪器责任有限公司; THZ-82 恒温振荡器, 常州国华电器有限公司;

收稿日期: 2008-01-23

基金项目: 国家“863”项目(2007AA02Z200); “十一五”国家科技支撑计划(2006BAK03A06)

作者简介: 张晓晓(1981-), 女, 硕士生; 刘晓宁(1953-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物高分子材料及其在现代医药中的应用的研究, 通讯联系人, 025-83587347, xiaoningliu@163.com。

JY92-2D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科技股份有限公司。

1.2 PS-Phe-Ni²⁺ 树脂的制备及 Ni²⁺ 螯合容量的测定

在单口烧瓶中加入 PS-Acy L-Cl 和 1,2-DCE, 溶胀之后, 加入质量分数 45% 的 NaOH 水溶液、L-Phe 和 TEBA 于油浴中反应一定时间。反应后产物用蒸馏水和乙醇交替洗数遍, 质量分数 5% 盐酸洗涤 10 次, 水洗至中性后, 甲醇洗滤 5 次, 真空干燥至恒重, 得到苯丙氨酸树脂 (PS-Acyl-Phe), 合成路线如图 1。

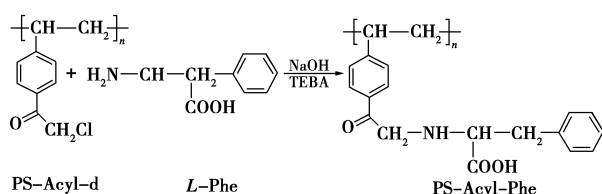


图 1 苯丙氨酸树脂合成路线

取一定质量 PS-Acyl-Phe 加入 Ni²⁺ 溶液, 25℃ 下振荡一定时间吸附 Ni²⁺, 取出溶液后按 Ni²⁺ 的测定方法^[7]测定溶液中 Ni²⁺ 的浓度 (mol/L)。吸附完毕用蒸馏水、甲醇洗涤树脂, 干燥得到 PS-Phe-Ni²⁺, 计算 Ni²⁺ 螯合量 Q (mmol/g)。

1.3 PS-Phe-Ni²⁺ 树脂纯化醛糖还原酶融合蛋白

1.3.1 醛糖还原酶融合表达

将本实验室已构建好的 N 端带 6-his 标签的融合表达基因载体 pET-15b(+)-GRE3 在大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中表达, 挑取单菌落到 LB 培养基 (含 75 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素) 中, 37℃ 振荡培养过夜。然后按照 2% 接种量接种到 LB 培养基 (含 75 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素) 中, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度为 0.7 mmol/L), 诱导表达 8 h^[8]。

大肠杆菌完全培养基为 LB(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10。

1.3.2 粗酶液制备

取 50 mL 诱导后的培养液经 5 000 r/min、4℃ 离心 10 min 收集菌体。用 pH=7.4 磷酸缓冲液洗涤 2 次后, 菌体重悬置冰浴中超声破碎之后于 5 000 r/min、4℃ 离心 15 min, 取上清为粗酶液 (蛋白溶液) 用于亲和吸附。

1.3.3 酶活力测定

酶活力测定采用分光光度法^[9]。反应体系为: 0.2 mol/L D-木糖、0.008 mmol/L NADPH、100

mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 总体积 3 mL。以不含木糖的反应液为测定空白, 340 nm 处测定每分钟光吸收值。在标准反应混合物中, 酶活力单位 (U) 定义为每分钟氧化 1 μmol NADPH 所需的酶活。

1.3.4 亲和吸附

将蛋白溶液加入装有 PS-Phe-Ni²⁺ 树脂 (树脂预先使用 20% 的乙醇溶胀 12 h) 的离心管中, 于 4℃ 在摇床上进行亲和吸附 12 h, 吸附完毕后测定溶液中蛋白质量浓度 (mg/mL), 计算 PS-Phe-Ni²⁺ 树脂的吸附容量 Q_1 (mg/g)。蛋白质量浓度用考马斯亮蓝法测定^[8]。

1.3.5 梯度洗脱^[10]

吸附结束, 将离心管中的蛋白溶液吸干, 用磷酸缓冲溶液洗涤树脂 2 次, 弃去洗液。将树脂转移至吸附柱中, 分别用咪唑浓度为 10、20、50、100、200、300、400 mmol/L 的磷酸缓冲液洗涤树脂 2~3 次, 收集每个浓度的洗脱液, 取微量经丙酮沉淀过夜, 进行 SDS-PAGE 电泳观察目的蛋白的洗脱位置及杂蛋白的洗脱情况。

2 结果与讨论

2.1 PS-Acyl-Phe 对 Ni²⁺ 的螯合性能

PS-Acyl-Phe 树脂在 1 h 内即可达到对 Ni²⁺ 的最大螯合量, 且螯合较为牢固, 振摇 25 h 内螯合量基本不变。由于乙酰羰基和 Phe 的协同螯合作用, 导致 PS-Acyl-Phe 树脂对 Ni²⁺ 的螯合速度很快, 在较短时间内即可达到吸附平衡, 且螯合较为牢固。当 Ni²⁺ 浓度为 0.2 mmol/L 时, 螯合量达到 0.868 mmol/g, 与文献报道的金属亲和层析介质的镍含量相比, 螯合量较高^[2], 有利于提高蛋白吸附量。

2.2 PS-Phe-Ni²⁺ 树脂对醛糖还原酶融合蛋白的纯化

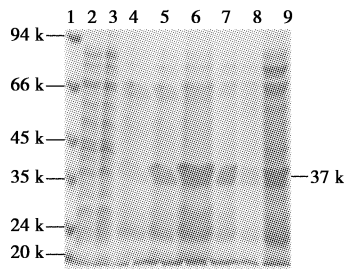
2.2.1 溶胀时间对蛋白吸附量的影响

将 2 份 PS-Phe-Ni²⁺ 螯合树脂分别用 20% 的乙醇浸泡润湿 1 h 和 12 h, 比较溶胀时间对蛋白吸附量的影响。结果显示, 延长浸泡时间因使树脂充分润湿而增加了树脂与蛋白的作用, 12 h 比 1 h 的溶胀提高吸附量约 24%。

2.2.2 粗酶液中咪唑浓度对蛋白纯化的影响

为了简化操作, 将粗酶液不经过硫酸胺沉淀、透析除盐等预处理, 直接用于亲和吸附。收集 10、20、50、100、200、300、400 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱的解离液, 进行 SDS-PAGE 电泳观察目的蛋白 (目的蛋白相对分子质量为 37 K) 的洗脱位置及杂蛋白的

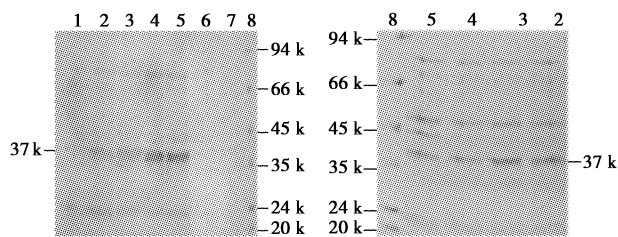
洗脱情况(见图2)。



1、2、3、4、5、6、7、8、9 分别是蛋白分子质量 marker、10、20、50、100、200、300、400 mmol/L 咪唑洗脱液、粗酶液

图2 蛋白洗液的 SDS-PAGE 分析

咪唑浓度分别为 10、20 mmol/L 的洗脱液可以洗掉大量的杂蛋白,而随着咪唑浓度的增大,解离液中开始出现目的蛋白。在 100 ~ 300 mmol/L 的浓度下,目的蛋白大部分被解离下来,且集中在 200 mmol/L 处,而在 400 mmol/L 处基本无蛋白从树脂上解离下来。由此可以说明所制备的 PS-Phe-Ni²⁺ 螯合树脂对目的蛋白存在较强的特异性吸附,但从图中也可看出 100 ~ 300 mmol/L 处在含有大量目的蛋白的同时也存在较深的背景条带,即树脂对蛋白具有一定的非特异性吸附。因此为了降低树脂的非特异性吸附,在粗酶液中分别加入低浓度的咪唑分别有 3 mmol/L 和 8 mmol/L(终浓度),进行吸附洗脱,分别观察其纯化效果(见图3)。



(a) 3 mmol/L 咪唑

(b) 8 mmol/L 咪唑

1、2、3、4、5、6、7、8 分别为 400、300、200、100、50、20、10 mmol/L 咪唑洗脱液、蛋白分子质量 marker
1、2、3、4、5 分别为蛋白分子质量 marker、50、100、200、300 mmol/L 咪唑洗脱液

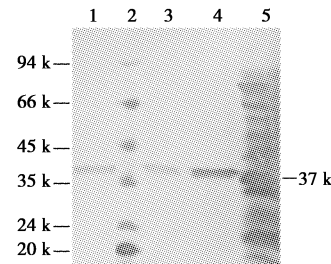
图3 在粗酶液中加入咪唑得到的蛋白洗脱液的 SDS-PAGE 分析

将图3(a)图与图2进行比较可发现,图3(a)背景条带变浅,且在低浓度咪唑处(50 mmol/L)即解离下大量的目的蛋白,而图2的目的蛋白大部分集中在 200 mmol/L 处。比较图3(b)与图3(a),前者在 100 ~ 300 mmol/L 处只出现了 3 条蛋白条带,说明非特异性吸附大大降低了,但同时其目的蛋白含量也明显低于图3(a)。

因此可说明,在粗酶液中加入 3 mmol/L 咪唑可

以较有效地降低非特异性吸附,且目的蛋白含量没有显著减少;而加入 8 mmol/L 咪唑虽然只含有 2 条杂蛋白条带,但目的蛋白含量也大大降低了。

为了得到更好的纯化效果,收集含 3 mmol/L 咪唑的粗酶液在 50 ~ 100 mmol/L 处的解离液,将其浓缩之后进行 3 次吸附洗脱,其纯化结果见图4。



1、2、3、4、5 分别为 200 mmol/L 咪唑洗脱液、蛋白分子质量 marker、100 mmol/L 咪唑洗脱液、50 mmol/L 咪唑洗脱液、粗酶液

图4 二次纯化 SDS-PAGE 分析

从图4可以看出绝大部分目的蛋白在 50 mmol/L 处即可解离下来,在 100 和 200 mmol/L 处只含有少量的目的蛋白,且 50 ~ 200 mmol/L 的解离液均得到单一条带,通过测定比酶活为 66.12 U/mg,纯化倍数达到 30 倍,说明使用该树脂可很好地纯化醛糖还原酶融合蛋白。

3 结语

以聚苯乙烯树脂作为载体,用氯乙酰氯对其进行功能化反应,制得了氯乙酰化聚苯乙烯,之后再引入苯丙氨酸(Phe)和镍离子,制备了一种聚苯乙烯型金属螯合树脂,该树脂由于乙酰羰基和 Phe 的协同作用,对 Ni²⁺ 螯合牢固且螯合量大,有利于提高蛋白吸附量。该树脂可较好的纯化融合蛋白,且操作简单、周期短,有望在融合蛋白纯化方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 王珺,徐开俊,王礼琛.催化不对称合成法在手性药物合成中的应用[J].药学进展,2005,29(3):106-111.
- [2] 刘平,张双全,闫晓梅,等.固定化镍离子亲和层析胶的制备及其性能鉴定[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(2):267-269.
- [3] Zachariou M, Heam M T W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilized hard lewis metal ion-chelate adsorbents[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 890:95-116.
- [4] Liao Y C, Syu M J. Novel immobilized metal ion affinity adsorbent based on cross-linked-cyclodextrin matrix for repeated adsorption of α -amylase [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 23: 17-24.

(下转第 61 页)

1.2 合成路线

其合成路线见图1。

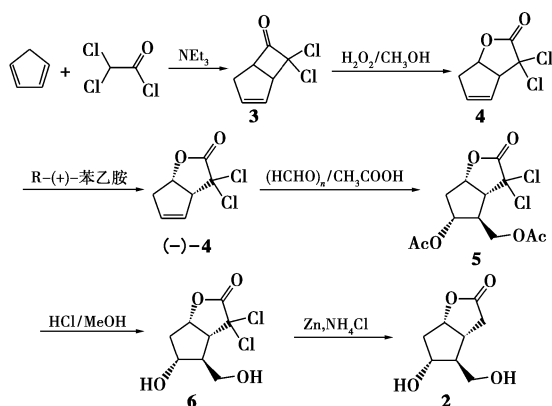


图1 合成路线

1.2.1 7,7-二氯双环[3.2.0]庚-2-烯-6-酮(3)的合成

参照文献[15]操作,得无色液体(3),收率97.0%,纯度99.0%。

1.2.2 3,3-二氯-3,3a,6,6a-四氢-2H-环戊并[b]咪喃-2-酮(4)的合成

向250 mL三口瓶中加入35.4 g(0.2 mol) 3,50 mL甲醇和50 mL水,搅拌冷却至-20~-10℃。缓慢滴加31.4 g 35%的双氧水,滴毕再在30 min内滴加42.0 mL 5 mol/L的氢氧化钠溶液,继续搅拌6 h,放置过夜。向反应液中加入18.2 g 亚硫酸钠,搅拌30 min。反应混合物用19.6 mL浓盐酸中和,分别用100、50、40 mL乙酸乙酯提取。将乙酸乙酯提取液合并,用蒸馏水洗涤,减压浓缩。残留物用4.0 mL甲醇溶解,搅拌下滴入14.0 mL正己烷,滴毕,放入冰箱中冷却得到浅黄色固体(4) 26.0 g,收率67.3%,熔点57.2℃。¹H-NMR(CDCl₃), δ: 2.68~2.86(2H, m), 3.93~4.18(1H, m), 5.08~5.30(1H, m), 5.54~6.12(2H, m)。

1.2.3 3,3-二氯-3,3a,6,6a-四氢-2H-环戊并[b]咪喃-2-酮(4)的拆分

称取96.5 g(0.5 mol)化合物4,投入带搅拌的

1 000 mL三口瓶中,加250 mL水搅拌。再称取22.4 g(0.56 mol)氢氧化钠,用50 mL蒸馏水溶解,加入此三口瓶中,升温至60℃后继续搅拌2 h。冷却至室温后,用2 mol/L HCl将溶液pH调至8.5。将60.6 g(0.5 mol) R-(+)-苯乙胺溶于250 mL 2 mol/L盐酸中后,用滴液漏斗慢慢滴入反应液中。溶液减压浓缩,有机盐用600 mL乙酸乙酯分4次提取。提取液浓缩至100 mL,放置过夜。析出白色沉淀,过滤,用乙酸乙酯重结晶2次得2,2-二氯-2-(5-羟基环戊-2-烯基)乙酸 R-(+)-苯乙胺盐62.7 g, $[\alpha]_D^{20} = -17.6^\circ (c = 1.02, \text{甲醇})$ 。

将此盐溶于200 mL蒸馏水中,室温搅拌下滴入1 mol/L氢氧化钠溶液,使溶液pH=9.5,用乙醚提取2次。水溶液用2 mol/L盐酸中和至pH=3.0,减压浓缩,残余物用200 mL乙醚提取2次,无水硫酸镁干燥,减压蒸除溶剂得白色固体[(-)-4] 33.9 g,收率35.1%。 $[\alpha]_D^{20} = -61.7^\circ (c = 1.03, \text{甲醇})$,熔点90.0℃。

1.2.4 (3aR,4S,5R,6aS)-3,3-二氯-5-羟基-4-(羟甲基)六氢-2H-环戊并[b]咪喃-2-酮(6)的合成

在500 mL三口瓶中加入19.3 g多聚甲醛、38.6 g(0.2 mol)化合物(-)-4、193 mL冰醋酸,水浴加热至50℃,缓慢滴加6.5 mL浓硫酸,控制滴加速度使反应液温度在60℃以下。加毕升温至75~80℃继续搅拌24 h。冷却至室温,用无水碳酸钠中和至pH 5.0。减压蒸除冰醋酸,残余物溶于300 mL二氯甲烷中,并依次用饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化钠溶液和蒸馏水洗涤,用无水硫酸镁干燥。减压蒸除溶剂,得化合物5的粗品。

在1 000 mL三口瓶中加入化合物5、500 mL甲醇和20 mL浓盐酸,加热回流4 h。反应液用冰盐浴冷却至0℃后,用饱和碳酸氢钠溶液中和至pH 4.0,减压浓缩。残余物用氯仿加热溶解,热过滤,滤液放冷后,析出白色晶体,过滤,干燥得精品(6) 36.2 g,收率75.1%。 $[\alpha]_D^{20} = -52.9^\circ (c = 1.0, \text{甲醇})$,熔点102.5℃。IR(KBr), ν/cm^{-1} : 3 260, 1 780, 1 210, 1 170,

(上接第59页)

- [5] Davankov V, Tsyurupa M, Ilyin M, *et al.* Hypercross-linked polystyrene and its potentials for liquid chromatography: A mini-review[J]. *J Chromatogr*, 2002, 965: 65-73.
- [6] 魏荣卿, 王强, 刘晓宁. 氯乙酰化聚苯乙烯型固载体的制备[J]. *离子交换与吸附*, 2005, 21(4): 289-296.
- [7] 陈闰子, 李阿丹, 佟琦. 镍铁合金镀液中 Ni²⁺ 含量的光度测定[J]. *冶金分析*, 2002, 22(6): 54-55.

- [8] 汪家政, 泛明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 90-92.
- [9] 曹丹燕, 李艳, 张清, 等. 酿酒酵母 CICC1747 醛糖还原酶基因的克隆及表达[J]. *生物加工过程*, 2006, 4(2): 46-50.
- [10] Efremenko E, Votchitseva Y, Plieva F, *et al.* Purification of His₆-organophosphate hydrolase using monolithic supermacroporous polyacrylamide cryogels developed for immobilized metal affinity chromatography[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70: 558-563. ■