

聚乙二醇修饰重组溶葡萄球菌酶的初步研究

王 永^{1*} 刘沐荣² 万海同¹ 刘 翔² 张加慧² 封小燕² 张 钊¹

(1 浙江中医药大学生物工程学院 杭州 310053 2 杭州北斗生物技术有限公司 杭州 310011)

摘要 目的: 探讨聚乙二醇(PEG)修饰重组溶葡萄球菌酶(lysostaphin)的反应条件以及修饰后产物的纯化方法。方法: 采用超声波细胞粉碎机进行菌体破碎, 阳离子交换层析、疏水层析进行蛋白纯化; 在不同条件下, 将活化的单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA)与纯化后的lysostaphin反应, 以单个PEG-Lysostaphin的比例为指标, 用SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS方法确定其在修饰产物中的所占比例; 采用Sephacryl S-200分子筛凝胶层析法对修饰产物进行分离纯化。结果: mPEG-SPA修饰lysostaphin的反应条件为pH 8.0, 温度4℃, lysostaphin与mPEG-SPA的质量比为1:5, 反应时间2.0h; 反应产物经一步Sephacryl S-200分子筛凝胶层析纯化后, 初步实现分离。结论: 初步确定了聚乙二醇修饰lysostaphin的反应条件及修饰产物的纯化方法。

关键词 聚乙二醇 重组溶葡萄球菌酶 纯化 单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺丙酸酯

中图分类号 Q819

溶葡萄球菌酶(lysostaphin)由Schindler等^[1]于1964年首次从一株编号为NRRL B-2628的模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)培养物中发现并分离。此酶为246个氨基酸组成的单链分子, 分子量27kDa, 等电点PI介于10.4~11.4之间, 其中锌为必须的辅助因子^[2-4]。它能特异性水解细菌细胞壁肽聚糖交联结构甘氨酸五肽桥联中第2位和第3位甘氨酸形成的肽键^[5], 因此具有破壁溶菌的作用。由于甘氨酸五肽桥联结构仅大量存在于葡萄球菌细胞壁中, 其中又以金葡萄球菌细胞壁分布最广, 因此lysostaphin主要对葡萄球菌尤其是金黄色葡萄球菌具有杀菌溶菌作用^[6]。然而lysostaphin作为一种体外抗菌药物, 固体状态保存时往往不利于应用, 液体状态存储时稳定性则比较差。为了提高溶葡萄球菌酶的热稳定性, 我们拟通过PEG修饰技术对溶葡萄球菌酶进行多点修饰。为此, 本文进行了溶葡萄球菌酶的制备、纯化, 修饰条件筛选, 修饰产物的分离纯化以及热稳定性考察等研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 M-SPA (M. W. 5000) (Jekem Technology); 胰蛋白胨和酵母粉 (OXOID 公司); Amp (氨苄青霉素) (华北制药股份有限公司); IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)、SDS (北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司); 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma 公司); 其余试剂均为分析纯或生化纯试剂。

1.1.2 菌株 含有pET-22b-lysostaphin表达质粒的BL-21(DE3)菌株、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌BL-21(均为本实验室保存)。

1.1.3 仪器 立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 超声波细胞粉碎机 (宁波莱顺科技仪器有限公司); BECKMAN 高速冷冻离心机 (德国 BECKMAN); AKTA prime (Amersham Biosciences 公司); SP-Sephacryl S-200 分子筛凝胶层析柱、Sephacryl S-200 High Resolution 色谱柱 (GE Healthcare 公司); Butyl Sepharose 4 Fast Flow 色谱柱、Sephadex G-25 色谱柱 (Amersham Biosciences 公司); Power PAC300/Mini Proteom 电泳仪 (Bio-Rad 公司); TU1810DPC 紫外可见分光光度计 (上海沪粤明科学仪器有限公司); Biflex III

收稿日期: 2013-01-29 修回日期: 2013-04-11

* 电子邮箱: wangyong19870602@126.com

型 MALDI-TOF-MS(ABI 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 菌种培养及诱导表达 从划线平板上挑取含 pET-22b-lysostaphin 表达质粒的重组 *E. coli* BL-21 (DE3) 单菌落,接种于 LB 培养基(pH 7.0,含氨苄青霉素 100 μ g/ml)中,37 $^{\circ}$ C 振荡(220r/min)培养过夜,以 1% 接种量转接于 5L LB 培养基(pH 7.0,含氨苄青霉素 100 μ g/ml)中,继续振荡培养约 3h,待生长至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时,加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG, 终浓度为 1.0mmol/ml),30 $^{\circ}$ C 振荡(220r/min)培养诱导 3h,将菌液于 4 $^{\circ}$ C 条件下,7000r/min 离心 15min 收集菌体。

1.2.2 重组溶葡萄球菌酶的制备及纯化 按 1 克菌体加 20ml 破菌缓冲液的比例,在菌体中加入预冷的破菌缓冲液(40mmol/L Tris-Cl⁻,0.2mol/L NaCl,0.5mmol/L EDTA,pH7.5),用磁力搅拌器将菌体混匀,混匀后的菌体在冰浴下用超声波细胞粉碎机破碎,破菌液经 10000r/min 离心 40min 收集上清;上清经 20mmol/L Tris-Cl⁻适当稀释后上样于 SP-Sepharose 层析柱,用 0.1~0.5mol/L NaCl,pH 7.5,20mmol/L Tris-Cl⁻缓冲液进行洗脱,分布收集洗脱液;SP 阳离子交换层析所得组分经 20mmol/L Tris-Cl⁻缓冲液适当稀释后[含终浓度为 1.0mol/L (NH₄)₂SO₄]继续上样于 Butyl Sepharose 疏水层析柱,用 pH 7.5,20mmol/L Tris-Cl⁻缓冲液进行洗脱,收集洗脱液;Butyl Sepharose 疏水层析所得组分继续上样于 Sephadex G-25 脱盐柱进行脱盐,50mmol/L NaCl,pH 7.5,40mmol/L PB 缓冲液进行洗脱,收集洗脱液。以上各组分经超滤膜适当浓缩后用 SDS-PAGE 电泳检测纯度。

1.2.3 聚乙二醇化溶葡萄球菌酶结合物的合成及纯化 (1)pH 值的筛选 取纯化后的 lysostaphin 液体 3 份,把 pH 值分别调节为 7.5,8.0,8.5,按照溶葡萄球菌酶:mPEG₅₀₀₀-SPA = 1:5 (mg:mg) 加入 mPEG₅₀₀₀-SPA,4 $^{\circ}$ C 条件下,磁力搅拌反应 2h,加入 Gly 终止反应。

(2) 投料比的筛选 取纯化后的 lysostaphin 液体 4 份,把 pH 值调节为 8.0,分别按照质量比溶葡萄球菌酶:mPEG₅₀₀₀-SPA = 1:0.5,1:1,1:3,1:5 加入 mPEG₅₀₀₀-SPA,4 $^{\circ}$ C 条件下,磁力搅拌反应 2h,加入 Gly 终止反应。

(3) 修饰产物的纯化 将修饰后产物上样于 Sephacryl S-200 分子筛凝胶层析柱,以 40mmol/L PB 进行洗脱,分别收集洗脱峰。

1.2.4 酶活性及蛋白含量测定 采用比浊法^[7]进行酶活性测定,规定:pH 7.5 条件下 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min 将金葡菌悬液 6ml 从比浊度(A_{620})0.250 降至 0.125 所需的酶量定义为 1U。溶葡萄球菌酶蛋白含量按照 Lowry 法^[8]进行测定,BSA 为标准蛋白。

1.2.5 溶葡萄球菌酶及 PEG 修饰酶的热稳定性考察 在 45 $^{\circ}$ C 条件下,分 3 组对溶葡萄球菌酶修饰前后的热稳定性进行考察。具体操作方法如下:第一组用 pH7.5 的 40mmol/L PB 将 lysostaphin 稀释成 0.5mg/ml;第二组用辅料(终浓度为 40mmol/L PB、20mg/ml 甘露醇、20mg/ml 丙氨酸、15% 甘油、pH7.5)将 lysostaphin 稀释成 0.5mg/ml;第三组用辅料将 PEG-lysostaphin 稀释成 0.5mg/ml。将其放入 45 $^{\circ}$ C 的恒温箱中,每隔一定时间取出酶液,37 $^{\circ}$ C 下测定其酶活力,最后将测得的各个时段的酶活与各初始酶活相比较,计算出经过不同时间后的残余酶活,从而可以比较热稳定性的变化。

2 结 果

2.1 重组 lysostaphin 的制备及纯化

菌体经超声破碎后,lysostaphin 主要以可溶性蛋白形式存在于破菌上清中,破菌沉淀中仅含有少许蛋白,经过一步 SP 阳离子交换层析纯化后,SDS-PAGE 电泳显示纯化后蛋白纯度达到 80%~85% 左右(图 1),SP 纯化后蛋白进一步进行 Butyl-HIC 纯化,SDS-PAGE 电泳显示,HIC 纯化后蛋白为一单一条带,纯度可以达到 95% 以上(图 2),可以用于 PEG 修饰。

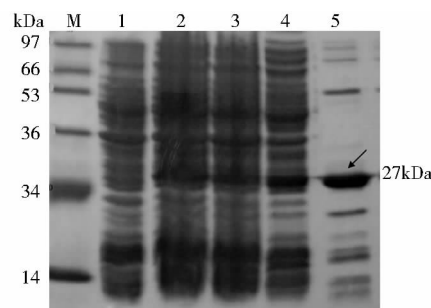


图 1 SP 纯化图像

Fig. 1 SP purification

M: Standard marker; 1: BL-21; 2: Lysostaphin bacteria; 3: Sediment; 4: Supernatant; 5: SP purified lysostaphin

2.2 聚乙二醇化溶葡萄球菌酶结合物的合成及纯化

Lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比 1:5 进行反应后,SDS-PAGE 电泳图谱分析可知 98% 的

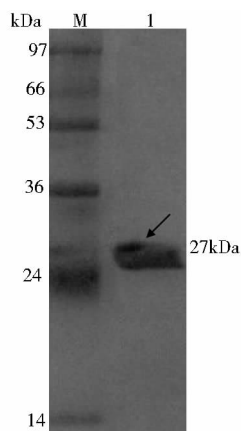


图2 HIC 纯化图像

Fig.2 HIC purification

M: Standard marker; 1: HIC purified lysostaphin

lysostaphin 被 mPEG₅₀₀₀-SPA 修饰上, 其中 pH8.0 时修饰率较高(图3)。在 pH8.0 时, 当 Lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比为 1:1 反应时, Lysostaphin 过量, 仅有一个 Lys 位点偶联上 PEG 分子(图4、图5); 随着 mPEG₅₀₀₀-SPA 投料比的增加, 修饰率相应增加(图5), 当 Lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比为 1:3 反应时, 有 3~6 个 Lys 位点偶联上 PEG 分子, 其中以偶联上 4~5 个 PEG 产物居多(图6); 当 Lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比为 1:5 反应时, 修饰率最高, 有 5~8 个 Lys 位点偶联上 PEG 分子(图7); mPEG₅₀₀₀-SPA 修饰后混合物经 Sephacryl S-200 分子筛凝胶层析纯化后, 先后出现 2 个洗脱峰, 峰 1 为 PEG-lysostaphin, 峰 2 为 mPEG₅₀₀₀-SPA (图8), 在图谱上未出现 lysostaphin 洗脱峰, 这说明当 Lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比为 1:5 反应时, lysostaphin 大部分参与了反应, Sephacryl S-200 分子筛凝胶层析基本上实现了反应后产物的分离, 分离效果较好。

2.3 酶活性及蛋白含量测定

修饰前 lysostaphin 的浓度为 1.24mg/ml, 修饰后蛋白经超滤膜适当浓缩后浓度为 0.58mg/ml。修饰前 lysostaphin 的比活力为 457U/mg, 经 mPEG₅₀₀₀-SPA 修饰后, 随着修饰率的增加, PEG-lysostaphin 的体外活性相应减少, 其中 lysostaphin 与 mPEG₅₀₀₀-SPA 按照质量比 1:5 修饰时修饰度最高但活性只保持了 25% 左右。

2.4 热稳定性考察

从实验数据可以看出: lysostaphin 的热稳定性相对较差, 在 45℃ 条件下放置 10h, 活性几乎降低了一半; 加过辅料的 lysostaphin 热稳定性有所提高, 这可能与甘

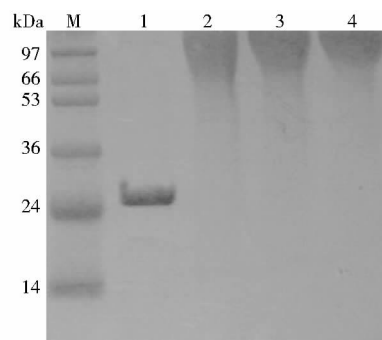


图3 不同 pH 值对 PEG 修饰 lysostaphin 的影响

Fig.3 Non-reduced SDS-PAGE profiles for lysostaphin modified by PEG at different pH

M: Standard marker; 1: Lysostaphin;

2: pH 7.5; 3: pH 8.0; 4: pH 8.5

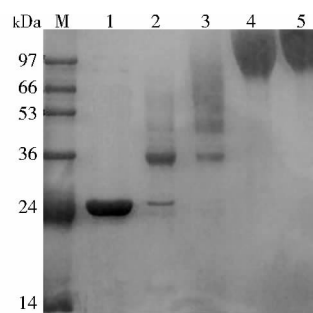


图4 不同投料比对 PEG 修饰 lysostaphin 的影响

Fig.4 Non-reduced SDS-PAGE profiles for lysostaphin modified by PEG at different mass ratios

at different mass ratios

M: Standard marker; 1: Lysostaphin; 2: 1:0.5; 3: 1:1;

4: 1:3; 5: 1:5

油、甘露醇等保护剂的使用有关; 而 PEG-lysostaphin 的热稳定性最好, 45℃ 条件下放置 60h 多, 仍保持了 20% 多的活性。由此可以得出 lysostaphin 经 PEG 修饰后可以显著提高热稳定性(图9)。

3 讨论

目前随着耐甲氧西林金葡萄菌(MRSA)等耐药葡萄球菌在医院和社区的流行, lysostaphin 作为一种专一抑制金葡萄菌药物而日益受到人们的青睐。然而由于 lysostaphin 在液体状态下稳定性较差, 极不易于 lysostaphin 的长期使用。PEG 修饰技术是目前延长蛋白质药物半衰期、提高稳定性的方法之一, 而它的利用恰恰能解决这一难题。目前关于 lysostaphin 聚乙二醇修饰的研究较少, 仅有 Walsh 等^[9]采用分枝状 PEG 对

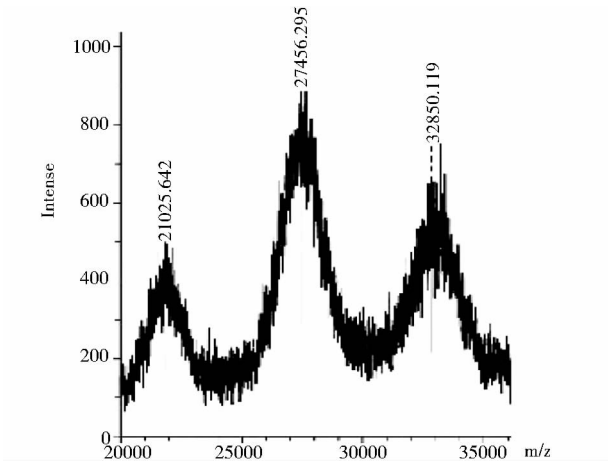


图 5 PEG-Lysostaphin (1:1) 的 MALDI-TOF-MS 图谱
Fig.5 PEG- Lysostaphin' s MALDI-TOF-MS diagram

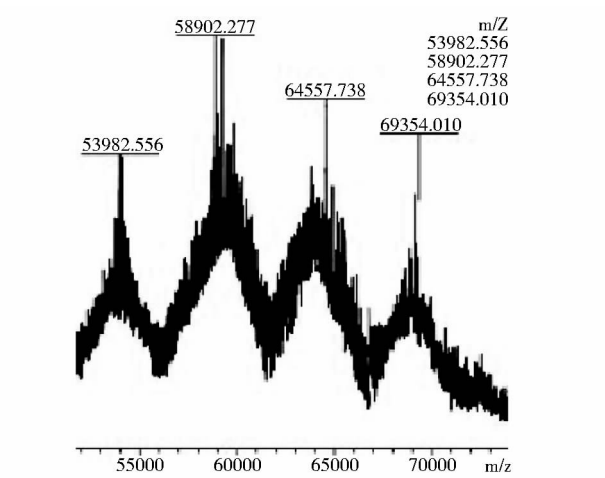


图 7 PEG-Lysostaphin (1:5) 的 MALDI-TOF-MS 图谱
Fig. 7 PEG-Lysostaphin' sMALDI-TOF-MS diagram

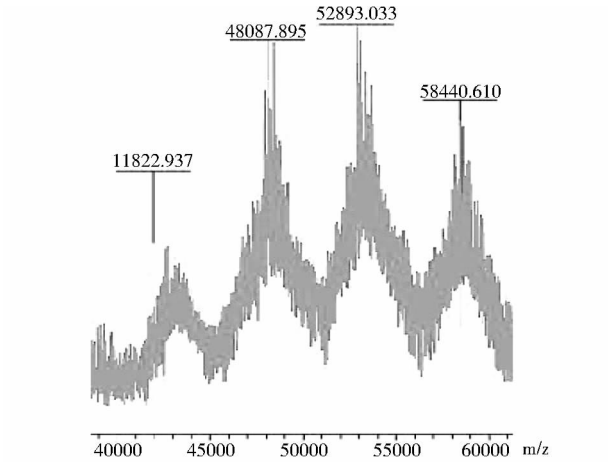


图 6 PEG-Lysostaphin (1:3) 的 MALDI-TOF-MS 图谱
Fig. 6 PEG-Lysostaphin' s MALDI-TOF-MS diagram

lysostaphin 进行多点修饰,修饰后产物半衰期可以达到 24h,但是酶活降低为原来的 1%,此外分枝状 PEG 价格昂贵,不适合产业化生产;吴宏等^[10]对 lysostaphin 进行突变加上巯基后利用 mPEG-MAL 对巯基进行定点修饰,但是经 mPEG-MAL 修饰后蛋白,酶活均有很大降低,其中酶活最高的 PEG-LysT146C 仅为原酶活的 20%。针对前人在 lysostaphin 聚乙二醇化中存在的问题,有必要继续通过其它的 PEG 修饰方法对 lysostaphin 进行修饰。

本研究成功构建了 pET-22b-lysostaphin 表达质粒载体,并实现了蛋白的可溶性表达。经多次重复实验发现在 SP 阳离子交换层析以及疏水层析纯化中,Tris



图 8 PEG-Lysostaphin 的分离纯化
Fig. 8 Purification of PEG-Lysostaphin
1 ;PEG-Lysostaphin;2; PEG

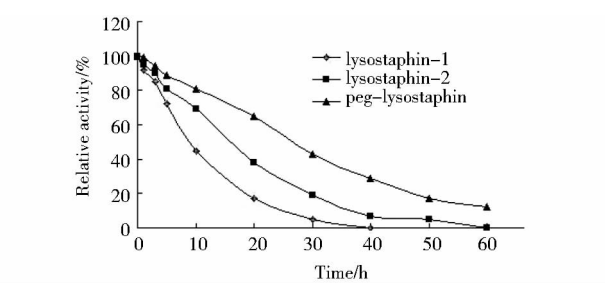


图 9 45℃条件下溶葡萄球菌酶及其修饰酶的活性
Fig. 9 The enzyme activity of lysostaphin and PEG-lysostaphin under the condition of 45℃

缓冲体系较 PB 缓冲体系在活性保持率、纯化效率方面都有所提高,因此我们选择 Tris 缓冲体系作为 lysostaphin 的纯化体系,但是由于 Tris 中的氨基能够与 PEG 发生反应,为了排除这一干扰,在重组 lysostaphin

脱盐一步,我们将 Tris 缓冲体系更换为 40mmol/L PB 缓冲体系,从而确立了高效、简单的 PEG 修饰 lysostaphin 的方法以及纯化工艺。实验中发现经过 PEG 修饰后的 lysostaphin 稳定性显著高于未修饰的 lysostaphin,但是随着修饰率的增加,lysostaphin 的酶活逐渐降低,当有 5~8 个 Lys 位点偶联上 PEG 分子时,活性保持 25% 的水平,国内目前未见相关报道。而导致活性降低的原因可能为大分子物质的化学结合影响了 lysostaphin 的空间结构,并且与 lysostaphin 化学结合的 PEG 的线性长链在 lysostaphin 分子周围包裹缠绕,形成了一道分子屏障,阻碍其活性部位与受体的结合,从而影响了抗菌活性的发挥。

PEG-lysostaphin 药物的开发旨在提高 lysostaphin 的稳定性,降低免疫原性,从而为此酶的全身用药奠定了物质基础。然而,当前的一个重要限制因素可能是溶葡萄球菌酶的空间结构尚不明确,虽然与溶葡萄球菌酶类似的 LytM 蛋白晶体结构和三级结构域已较为清楚^[11],可为溶葡萄球菌酶的改造提供一定参考,但只有进一步明确溶葡萄球菌酶自身的活性部位、底物结合域以及相互间的关系,才能更好地进行重组 lysostaphin 的 PEG 修饰。为了提高 PEG-lysostaphin 的活性,在后期的实验中我们将利用计算机模拟技术进行 lysostaphin 活性位点、PEG-lysostaphin 修饰位点的结构确认以及 PEG 单点修饰 lysostaphin 的研究。

参考文献

- [1] Schindler C A, Schuhardt V T. Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the staphylococcus. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964, 51 (3): 414-421.
- [2] Browder H P, Zygmunt W A, Young J R, et al. Lysostaphin: enzymatic mode of action. Biochem Biophys Res Commun, 1965, 19:383-389.
- [3] Hrlary R Trayer, Buckley C E. Molecular properties of lysostaphin, a bacteriolytic agent specific for *Staphylococcus aureus*. the Journal of Biological Chemistry. 1970, 245 (18), 4842-4846.
- [4] Maria do Carmo de Freire Bastos, Bruna Goncalves Coutinho, Marcus Lívio Varella Coelho. Lysostaphin: A *Staphylococcal* bacteriolysin with potential clinical applications. Pharmaceuticals, 2010, 3:1139-1161.
- [5] Michael W Climo, Kerstin Ehlert, Gordon L Archer. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45 (5): 1431-1437.
- [6] Paula Recsei, Alexandrad Gruss, Richard P Novick. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc Natl Acad Sci USA, Biochemistry, 1987,84(5): 1127-1131.
- [7] 杨信怡, 游雪甫, 蒋建东. 溶葡萄球菌酶的研究进展. 中国生化药物杂志, 2005, 26(6): 372-374.
Yang X Y, You X F, Jiang J D. Advances in lysostaphin research. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2005, 26 (6): 372-374.
- [8] Richard R Burgess, Murray P Deutscher. Guide to Protein Purification. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2011, 5:86-87.
- [9] Walsh Scott, Anjali Shah, James Mond. Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 2:554-558.
- [10] 吴宏, 房伟, 袁璟等. 溶葡萄球菌酶的定点突变与 PEG 巯基定点修饰. 生物工程学报, 2011, 27(11): 1623-1630.
Wu H, Fang W, Yuan J, et al. Site-directed mutagenesis and sulfhydryl PEGylation of lysostaphin. Chin J Biotech, 2011, 27 (11): 1623 -1630.
- [11] Odintsov S G, Sabala I, Marcy Janiak M, et al. Latent LytM at 1. 3 Å resolution. J Mol Biol, 2004, 16, 335(3): 775-785.

Chemical Modification of Lysostaphin with Activated Polyethylene Glycol

WANG Yong¹ LIU Mu-rong² WAN Hai-tong¹ LIU Xiang² ZHANG Jia-hui²
FENG Xiao-yan² ZHANG Fan¹

(1 Biological Engineering Institute of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

(2 BIODOOR Biotechnology Co., Ltd of Hangzhou City in Zhejiang Province, Hangzhou 310011, China)

Abstract Objective: To study the reaction conditions for the chemical modification of recombinant lysostaphin (Lysostaphin) with activated polyethylene glycol (PEG) and the methods for the purification of PEG-Lysostaphin. Methods: Disrupt the cell wall of bacteria by ultrasonic cell disruptor and purify the lysostaphin by Cation exchange chromatography (SP) and Hydrophobic chromatography (HIC); Lysostaphin was chemical modified with activated mono-methoxy polyethylene glycol succinimide propionate (mPEG - SPA) under various conditions, the ration of mono-mPEG-Lysostaphin was determined by SDS-PAGE and EMALDI-TOF-MS; The reaction mixture was purified by Sephacryl S-200 molecular size exclusion chromatography. Results: The optimal reaction was pH 8.0, temperature 4℃, 1:5 for the mass ratio of lysostaphin and mPEG, two hours for reaction time was selected. The reaction mixture was preliminarily separated by one step Sephacryl S-200 molecular size exclusion chromatography. Conclusion: It's preliminarily determined that the optimal reaction conditions for the chemical modification of lysostaphin with activated polyethylene glycol and the methods for the purification of PEG-Lysostaphin.

Key words Polyethylene glycol (PEG) Recombinant lysostaphin Purification mPEG-SPA