

## 磁珠固定化结核分枝杆菌二氢叶酸还原酶及其表征

周伟<sup>1</sup>, 卢进鹏<sup>1</sup>, 李亚平<sup>1</sup>, 杨林玉<sup>1</sup>, 胡小蕾<sup>1</sup>, 廖飞<sup>2</sup>, 杨晓兰<sup>1</sup>

1 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, 重庆 400016

2 重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054

周伟, 卢进鹏, 李亚平, 等. 磁珠固定化结核分枝杆菌二氢叶酸还原酶及其表征. 生物工程学报, 2019, 35(3): 513-521.

Zhou W, Lu JP, Li YP, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase immobilized on magnetic nanoparticles. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 513-521.

**摘要:** 比较 Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠和羧基磁珠固定结核分枝杆菌二氢叶酸还原酶 (*Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase, *Mt*DHFR), 探索适合小分子配体混合物库筛选的 *Mt*DHFR 固定化方法。重组表达带 6×His 标签 *Mt*DHFR, 纯化后表征酶学性质, 比较用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠和羧基磁珠固定化时相应固定化容量、保留活性、稳定性及对抑制剂响应。结果表明, Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠对 *Mt*DHFR 固定化容量为 (93±12) mg/g 磁珠 ( $n=3$ ), 但酶比活保留不超过 32%, Ni<sup>2+</sup>明显抑制酶活性, EDTA 与 Ni<sup>2+</sup>呈协同抑制效应, Fe<sup>3+</sup>无显著干扰。羧基磁珠活化固定 *Mt*DHFR 的容量 (8.6±0.6) mg/g 磁珠 ( $n=3$ ), 固定化酶比活保留 (87±4)% ( $n=3$ )。在含 50 mmol/L KCl 的 100 mmol/L HEPES (pH 7.0) 中, 游离和固定化 *Mt*DHFR 在 0 °C 保存 16 h 活性都无显著改变, 但在 25 °C 保存 16 h, 游离酶活性下降近 60% 而羧基磁珠固定化 *Mt*DHFR 活性下降仅 35%。甲氧喋呤对游离 *Mt*DHFR 和固定化 *Mt*DHFR 的 IC<sub>50</sub> 无显著差异 ( $P>0.05$ )。综上, Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠不适合固定化 *Mt*DHFR; 羧基磁珠固定化 *Mt*DHFR 能保留活性、热稳定性及对抑制剂的响应, 该固定化方法有望用于快速筛选其配体混合物库。

**关键词:** 磁珠, 固定化, 二氢叶酸还原酶, 配体混合物, 筛选

## Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase immobilized on magnetic nanoparticles

Wei Zhou<sup>1</sup>, Jinpeng Lu<sup>1</sup>, Yaping Li<sup>1</sup>, Linyu Yang<sup>1</sup>, Xiaolei Hu<sup>1</sup>, Fei Liao<sup>2</sup>, and Xiaolan Yang<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Medical Laboratory Diagnostics of the Ministry of Education of China, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

**Abstract:** To explore the immobilization of target proteins for screening libraries of ligand mixtures, magnetic submicron particles (MSP) functionalized with Ni<sup>2+</sup>-NTA and carboxyl were compared for the immobilization of *Mycobacterium*

**Received:** July 31, 2018; **Accepted:** November 26, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31570862, 81773625).

**Corresponding author:** Xiaolan Yang. Tel: +86-23-68485240; Fax: +86-23-68485239; E-mail: xiaolanyang666@yeah.net  
国家自然科学基金 (Nos. 31570862, 81773625) 资助。

网络出版时间: 2019-01-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190110.1329.002.html>

*tuberculosis* dihydrofolate reductase (*MtDHFR*). *MtDHFR* fused with 6×His was expressed, purified and characterized for kinetics. *MtDHFR* was immobilized on Ni<sup>2+</sup>-NTA-functionalized MSP directly and carboxyl-functionalized MSP upon activation. The immobilization capacity, residual activity, thermostability and affinities for putative inhibitors were characterized. *MtDHFR* immobilized on Ni<sup>2+</sup>-NTA-functionalized MSP retained about 32% activity of the free one with the immobilization capacity of (93±12) mg/g of MSP (*n*=3). Ni<sup>2+</sup> and EDTA synergistically inhibited *MtDHFR* activity, while Fe<sup>3+</sup> had no obvious interference. *MtDHFR* immobilized on carboxyl-functionalized MSP retained (87±4)% activity of the free one with the immobilization capacity of (8.6±0.6) mg/g MSP (*n*=3). In 100 mmol/L HEPES (pH 7.0) containing 50 mmol/L KCl, there was no significant loss of the activities of the free and immobilized *MtDHFR* after storage at 0 °C for 16 h, but nearly 60% and 35% loss of their activities after storage at 25 °C for 16 h, respectively. The inhibition effects of methotrexate on the immobilized and free *MtDHFR* were consistent (*P*>0.05). The immobilization of *MtDHFR* on carboxyl-functionalized MSP was thus favorable for higher retained activity and better thermostability, with promise for rapid screening of its ligand mixtures.

**Keywords:** magnetic particles, immobilization, dihydrofolate reductase, ligand mixture, screening

结核(Tuberculosis, TB)是由致病性结核分枝杆菌引起的全球流行病<sup>[1]</sup>。2016年约1 040万人患结核,发病率高于艾滋病,是全球主要的公共卫生问题<sup>[2]</sup>。现有结核治疗策略面临复发、药物副作用和多药耐药的风险<sup>[3-5]</sup>;应对结核,迫切需要新药<sup>[6-7]</sup>。二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)是细胞核酸代谢途径关键酶,是肿瘤和细菌感染的治疗靶标<sup>[8-9]</sup>。结核分枝杆菌与人的DHFR氨基酸序列一致性仅为26%左右,基于此结构差异有望设计结核分枝杆菌二氢叶酸还原酶(*Mycobacterium tuberculosis* DHFR, *MtDHFR*)选择性抑制剂<sup>[10]</sup>,使*MtDHFR*成为结核治疗药物的新靶点<sup>[11-12]</sup>。基于靶蛋白发现配体类药物先导化合物主要依靠筛选配体库。因此,建立适合筛选*MtDHFR*抑制剂库的技术体系,对发现治疗结核的化学新药具有重要意义。

传统方法筛选配体库需制备纯化合物库再高通量筛选,库制备成本高且效率低,筛选过程耗时且成本高。天然产物混合物和组合合成混合物作为配体库价值很大,而且库制备成本低且制备效率高,但筛选此类混合物库的技术难度巨大<sup>[13-15]</sup>。药用*MtDHFR*抑制剂需要具有高亲和力;目前筛选混合库发现高亲和力配体的方法,主要基于亲和结合、靶蛋白配体复合物分离和LC-MS分析<sup>[16-18]</sup>,但也仅限于成分含量相差不大的混合物

库。天然产物混合物或组合合成混合物中有效成分含量未知或极低,如何发现极低含量的有效成分仍是技术挑战<sup>[19]</sup>。本课题组建立了磁分离靶蛋白配体复合物后LC-MS分析筛选混合物组合库的方法<sup>[20-21]</sup>;在此基础上,优化竞争结合反应体系实现选择性迭代富集,可快速发现混合物中极低含量的高亲和力配体;LC-MS为成套的分析系统,靶蛋白大量活性表达、在磁珠表面固定化并保留其活性,就成为应用此策略的关键。

此前发现,对带6×His标签融合蛋白可用Ni<sup>2+</sup>-NTA磁珠位点选择性固定化以期保留活性<sup>[22]</sup>,但固定化体系必需Ni<sup>2+</sup>等重金属离子,而这些重金属离子可能影响固定化酶的活性。羧基磁珠也是固定化蛋白的常用载体,此固定化体系基本不会有重金属离子残留干扰酶活性。本研究经重组表达获得*MtDHFR*,比较Ni<sup>2+</sup>-NTA磁珠和活化羧基磁珠固定化对*MtDHFR*活性、稳定性及抑制剂响应的影响,以探索适合磁分离筛选配体混合物库的*MtDHFR*固定化方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与器材

Ni<sup>2+</sup>-NTA磁珠(批号20170714, 100 g/L)、羧基磁珠(Magnetic submicron particles carboxyl subtype F1, MSP-COOH-F1, 批号20171121,

120 g/L) 购自重庆博蓝鹰生物技术有限公司; 三乙醇胺 (Trolamine, TEA)、甲氨蝶呤 (Methotrexate, MTX)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 ( $\beta$ -NADPH)、 $\beta$ -巯基乙醇购自 Aladdin; 六水合氯化镍、硫酸铁、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、硫酸卡那霉素、2-吗啉乙磺酸 (4-Morpholineethanesulfonic acid, MES) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhaesulfonic acid, HEPES) 购自北京索莱宝科技有限公司; *E. coli* BL21 (DE3) 购自成都擎科梓熙生物技术有限公司; pET28a 购自中美泰和生物技术有限公司;  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 层析柱购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 二氢叶酸 (Dihydrofolic acid, DHF) 购自 Sigma 公司; N-羟基琥珀酸亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC) 购自东京化成工业株式会社, 其他试剂均为国产分析纯。日本岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计 (带恒温系统); 其林贝尔 QB-9001 快速振荡器; Promega 12 孔磁分离架; Millipore 8050 型超滤杯及再生纤维素超滤膜 (截留蛋白分子量 >10 kDa)。

## 1.2 *MtDHFR* 重组表达纯化及表征

### 1.2.1 *MtDHFR* 重组表达纯化

含 N 端携带 6 $\times$ His 标签的 pET28a(+):*dfrA* 表达质粒<sup>[23]</sup>委托中美泰和生物技术有限公司合成。质粒转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 培养, 经单克隆测序鉴定后, 于含有 100 mg/L 卡那霉素 LB 液体培养基中, 参照文献[23]进行 6 $\times$ His-*MtDHFR* 表达和纯化。用含 50 mmol/L KCl 的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 氮气正压 (0.15–0.20 Mpa) 超滤浓缩收集蛋白, Bradford 法测蛋白浓度<sup>[24]</sup>, 15% SDS-PAGE 分析蛋白纯度;

所得酶蛋白溶液于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.2 *MtDHFR* 的酶学性质表征

*MtDHFR* 活性测定: DHF 用含 10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 溶解至 1.0 mmol/L 溶液,  $\beta$ -NADPH 用去离子水溶解至 1.0 mmol/L 溶液; 反应缓冲液为含 50 mmol/L KCl 的 100 mmol/L HEPES (pH 7.0)<sup>[25]</sup>。*MtDHFR* 用反应缓冲液稀释至 40 mg/L。紫外分光光度计恒温至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 反应缓冲液调零, 反应总体积为 1.0 mL, 加终浓度均为 50  $\mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -NADPH 和 DHF, 400 ng *MtDHFR*, 混匀后延迟 10 s 用光度计连续监测 340 nm 处 3 min 内的消光变化; 取消光变化线性范围内的速度 ( $\Delta A/\text{min}$ ) 作为初始反应速度 ( $V$ ), 按设定的底物消耗消光系数 ( $\varepsilon=11\ 800\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ )<sup>[26]</sup> 计算酶活力, 1.0 min 内转化 1.0  $\mu\text{mol}$  底物所需酶量为一个活力单位。

*MtDHFR* 米氏常数: 文献报道  $\beta$ -NADPH 对 *MtDHFR* 的米氏常数  $K_{\text{mNADPH}}$  和 DHF 的米氏常数  $K_{\text{mDHF}}$  均约 4  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[27]</sup>。对于双底物酶, 使其中一个底物浓度大于 10  $K_{\text{m}}$  时改变另一底物浓度测定酶活, 双倒数分析确定表观  $K_{\text{m}}$ <sup>[28]</sup>。在 1.0 mL 含 400 ng 酶测定体系中, 固定 DHF 终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 在 2–10  $\mu\text{mol/L}$  间改变  $\beta$ -NADPH 终浓度 ( $S$ ), 测定初始反应速度 ( $V$ ), 回归分析  $1/V$  对  $\beta$ -NADPH 浓度倒数  $1/S$  响应得  $K_{\text{mNADPH}}$ ; 固定  $\beta$ -NADPH 终浓度 50  $\mu\text{mol/L}$ , 在 (0.5–10)  $\mu\text{mol/L}$  间改变 DHF 浓度, 同法测定  $K_{\text{mDHF}}$ 。

*MtDHFR* 热稳定性: 室温筛选配体操作过程不超过 4 h<sup>[20–21]</sup>。用酶反应缓冲液将 *MtDHFR* 稀释到 0.1 g/L, 于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 不同时刻取 *MtDHFR* 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  测定酶活分析其变化。

## 1.3 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠固定 *MtDHFR* 及表征

### 1.3.1 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠固定 *MtDHFR*

取  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠悬液 (100 g/L), 磁力回收磁珠后用固定缓冲液 (pH 7.0, 20 mmol/L

Tris-HCl) 洗 3 次并重悬为 7.5 g/L。取不同浓度 *MtDHFR* 溶液 40  $\mu$ L 预冷到 0  $^{\circ}$ C, 200 r/min 缓慢加入 10  $\mu$ L  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠 (约 75  $\mu$ g), 冰水浴中 200 r/min 振摇 30 min; 磁力分离取上清测剩余蛋白, 磁珠用固定缓冲液小心洗涤 3 次, 每次 200  $\mu$ L, 再重悬为 3 g/L, 于 0  $^{\circ}$ C 保存待用。

### 1.3.2 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠固定 *MtDHFR* 的容量及固定酶活性

用 Bradford 法测酶蛋白量<sup>[24]</sup>。固定时所用酶蛋白总量与上清酶蛋白量之差为固定化酶量。取饱和固载时单位量  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠固定酶量为固定化容量。用终点法测定固定化 *MtDHFR* 活性; 在 25  $^{\circ}$ C 恒温的 1.0 mL 酶反应体系中, 加 30  $\mu$ g 固定化 *MtDHFR* 的磁珠, 反应 3 min 后分离全部磁珠测定上清消光, 以不加固定酶磁珠为对照计算消光之差及其变化速度 ( $\Delta A/\text{min}$ )。

### 1.3.3 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 及 EDTA 对 *MtDHFR* 活性的影响

将  $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、EDTA 用酶反应缓冲液配成 5 mmol/L 溶液。在 1.0 mL 酶反应缓冲液中, 加不同终浓度的  $\text{Ni}^{2+}$ 、EDTA、 $\text{Fe}^{3+}$ , 分别与 400 ng *MtDHFR* 在冰上 200 r/min 作用不同时间;  $\text{Ni}^{2+}$  与 EDTA 作用 20 min 后再加 *MtDHFR* 400 ng 冰上作用不同时间; 然后恒温 25  $^{\circ}$ C 加底物测定酶活性。

## 1.4 羧基磁珠固定 *MtDHFR* 及表征

### 1.4.1 活化羧基固定 *MtDHFR*

取 MSP-COOH-F1 悬液 (120 g/L), 用 10 mmol/L MES 缓冲液 (pH 6.0) 的洗 3 次并重悬至 3 g/L。NHS 和 EDC 分别用预冷 10 mmol/L MES (pH 6.0) 配成 75 mmol/L、50 mmol/L 溶液。取 200  $\mu$ L 磁珠悬液 (约 600  $\mu$ g), 磁力分离去上清后加 NHS 和 EDC 各 100  $\mu$ L (摩尔比 1.5 : 1.0)<sup>[29]</sup>, 或各 50  $\mu$ L 再补充缓冲液至总体积 200  $\mu$ L, 室温 200 r/min 振摇反应 30 min 后磁力回收磁珠, 用预冷到 0  $^{\circ}$ C 的固定缓冲液 (pH 7.0 的 10 mmol/L MES) 洗 3 次

并重悬至 15 g/L, 于 0  $^{\circ}$ C 保存 (尽快使用)。在预冷到 0  $^{\circ}$ C 含一定量 *MtDHFR* 的 210  $\mu$ L 固定缓冲液中, 分批加入预冷的活化羧基磁珠 40  $\mu$ L (600  $\mu$ g); 在 0  $^{\circ}$ C 固定反应 30 min, 每隔 3 min 混匀一次。磁力回收磁珠, 用酶反应缓冲液洗涤并重悬至 3 g/L, 于 0  $^{\circ}$ C 保存备用。参照  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠固定化酶方法测定固定酶量。

### 1.4.2 光度法连续跟踪磁珠固定酶反应过程测定 *MtDHFR* 活性

于 1.0 mL 酶反应体系中, 分别在含底物 50  $\mu$ mol/L DHF、50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -NADPH 的反应缓冲液中加 240  $\mu$ g MSP-COOH-F1 及 1.0  $\mu$ g 酶, 25  $^{\circ}$ C 下比较底物加磁珠前后 340 nm 消光值  $A_{340}$  及其在酶作用下变化速度 ( $\Delta A/\text{min}$ ), 以消除磁珠对测定消光变化速度的影响。测定磁珠固定化酶活性时, 在 25  $^{\circ}$ C 的 1.0 mL 酶反应体系中加 75  $\mu$ g 固定酶磁珠, 以 10 s 间隔连续监测 3 min 内 340 nm 处消光变化, 并计算消光变化速度 ( $\Delta A/\text{min}$ ) 及对应酶活性。

### 1.4.3 羧基磁珠固定化 *MtDHFR* 和游离 *MtDHFR* 对 MTX 的响应

于 1.0 mL 酶反应体系中, 加 75  $\mu$ g 固定酶磁珠或 0.5  $\mu$ g 游离酶, 及不同终浓度 MTX (1.0–10.0 nmol/L), 25  $^{\circ}$ C 混匀 3 min 后加底物测定酶活。用 OriginPro 9.1 拟合抑制率对 MTX 浓度对数响应确定甲氨蝶呤对 *MtDHFR* 的  $\text{IC}_{50}$ 。

### 1.4.4 羧基磁珠固定 *MtDHFR* 储存稳定性

将固定酶磁珠 (3.0 g/L) 于 25  $^{\circ}$ C 水浴和冰水浴 0  $^{\circ}$ C 中静置保存, 于不同时刻取 75  $\mu$ g 磁珠测定酶活性; 分析活性随保存时间的变化。

## 1.5 数据处理方法

每个实验重复 3 次, 实验结果表示为平均值  $\pm$  标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ); 采用 OriginPro 9.1 进行数据处理; 统计学处理采用 SPSS 20.0,  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Mt*DHFR 表达和纯化

6×His-*Mt*DHFR 诱导表达后,粗酶液经 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析单次纯化,蛋白收率约为 12%,比活提高到 15 倍;超滤浓缩 3 次,蛋白收率约为 30%,但比活提高近 30%。纯化总倍数约 21 倍(表 1)。可见,高纯度 *Mt*DHFR 易于获得。SDS-PAGE 显示较纯的目的蛋白条带(图 1),分子量约为 20 kDa,符合预期。

### 2.2 *Mt*DHFR 米氏常数及其受 pH 的影响

#### 2.2.1 *Mt*DHFR 米氏常数

双倒数分析得  $K_{m\text{ DHF}}$  为  $(4.4\pm 0.2)\ \mu\text{mol/L}$  ( $n=3$ ) (图 2A),  $K_{m\text{ NADPH}}$  为  $(4.7\pm 0.5)\ \mu\text{mol/L}$  ( $n=3$ ) (图 2B),都与文献报道<sup>[27]</sup>接近。

#### 2.2.2 pH 对 *Mt*DHFR 活性影响

在 pH 4.0–8.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,

*Mt*DHFR 活性随 pH 增大而降低,到 pH 8.0 时几乎无活性(图 3)。*Mt*DHFR 活性在 pH 7.0 的 100 mmol/L

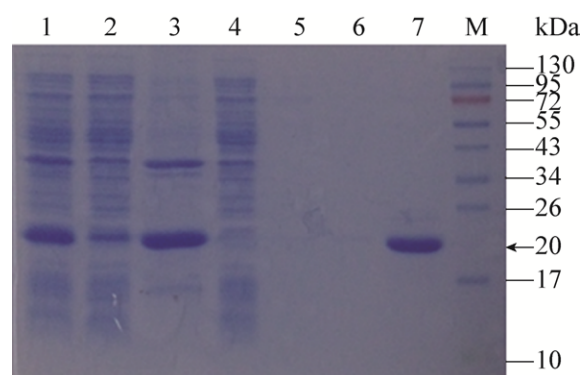


图 1 SDS-PAGE 检测 6×His-*Mt*DHFR 的纯化

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of 6×His-*Mt*DHFR after purification by Ni<sup>2+</sup>-NTA. Lane 1: lysate; lane 2: supernatant; lane 3: sediment; lane 4: flow through fractions; lane 5: fractions eluted with 10 mmol/L imidazole; lane 6: fractions eluted with 20 mmol/L imidazole; lane 7: fractions of target eluted with 500 mmol/L imidazole; M: marker.

表 1 *Mt*DHFR 表达纯化效果 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Expression and purification of *Mt*DHFR ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
Crude extract	135±12	30±1.5	0.2±0.1		
Purification from Ni <sup>2+</sup> -NTA	16±1.2	50±4.0	3.1±0.2	15.5	12
Ultra-filtration	4.8±0.4	20±1.7	4.2±0.2	21.0	30

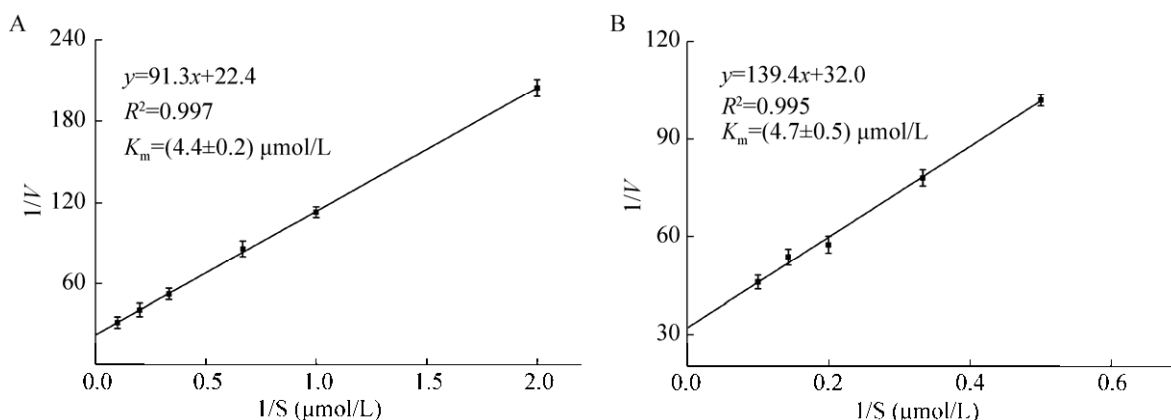


图 2 DHF (A) 和  $\beta$ -NADPH (B) 的表现  $K_m$

Fig. 2  $K_m$  of DHF (A) and  $\beta$ -NADPH (B).

HEPES 和 pH 7.0 的 50 mmol/L 磷酸盐中无差异，故用 pH 7.0 的 HEPES 测定酶活性<sup>[25]</sup>。

### 2.3 Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠固定 *MtDHFR* 及其表征

#### 2.3.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠固定 *MtDHFR* 容量及保留活性

用 75 μg Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠，随 *MtDHFR* 用量增加，固定化酶量逐渐增加直至饱和 (图 4)，固定化容量为 (93±12) mg/g 磁珠 ( $n=3$ )。固定化酶比活随 *MtDHFR* 用量增加而缓慢增加至稳定，但最大比活保留仅约为游离酶的 32%。

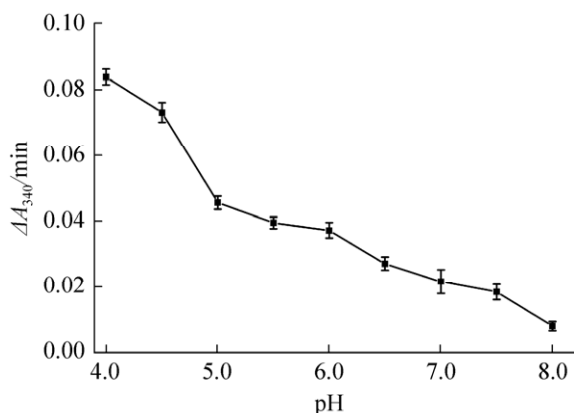


图 3 *MtDHFR* 活性的 pH 效应  
Fig. 3 pH effect on *MtDHFR* activity.

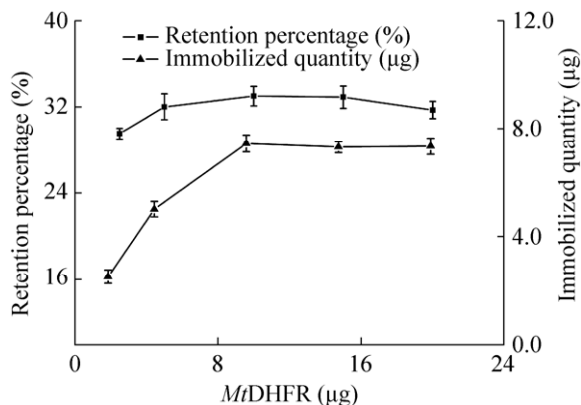


图 4 75 μg Ni<sup>2+</sup>-NTA 磁珠基于 6×His 固定 *MtDHFR* 的固定化量和表观比活保留比

Fig. 4 Immobilization capacity and residual activity percentage of 6×His-*MtDHFR* on Ni<sup>2+</sup>-NTA MSPs of 75 μg.

#### 2.3.2 Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>及 EDTA 对酶活的影响

Ni<sup>2+</sup>在 5–20 nmol/L 之间对 *MtDHFR* 活性产生浓度和时间依赖性抑制，20 nmol/L Ni<sup>2+</sup>抑制大于 50% (图 5A)。Fe<sup>3+</sup>对 *MtDHFR* 活性没有明显影响 (图 5B)。单独 EDTA 对 *MtDHFR* 活性可抑

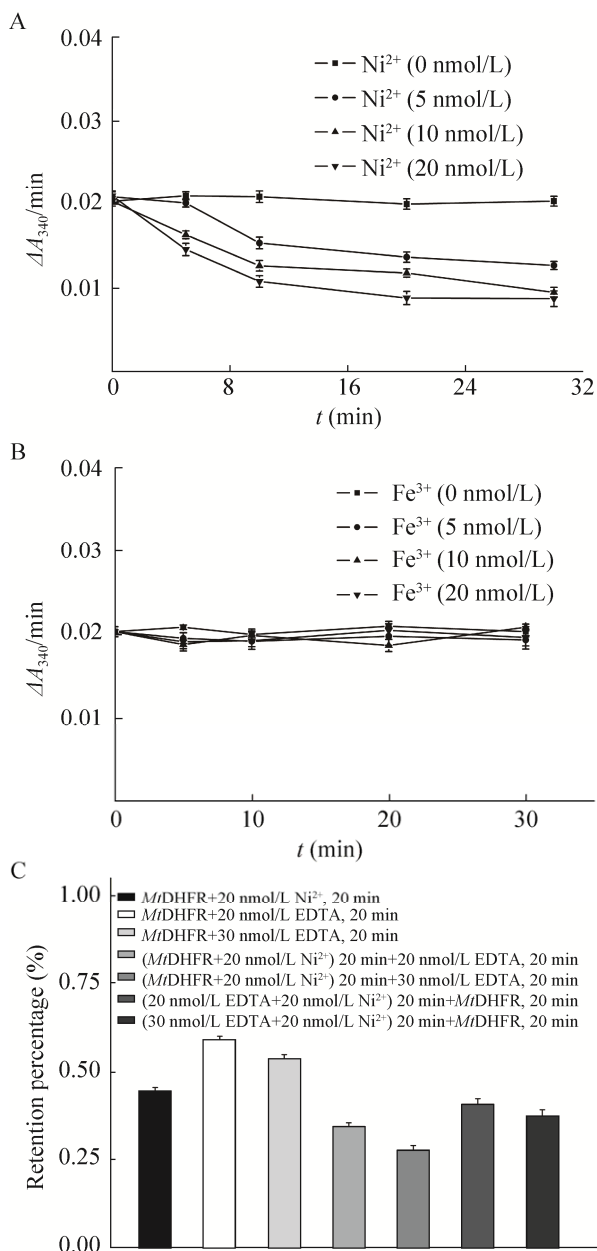


图 5 Ni<sup>2+</sup>(A)、Fe<sup>3+</sup>(B)、EDTA (C) 对酶活性的影响  
Fig. 5 Effects of Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> and EDTA on *MtDHFR* activity. (A) Ni<sup>2+</sup>. (B) Fe<sup>3+</sup>. (C) EDTA alone and it plus Ni<sup>2+</sup> in 100 mmol/L HEPES buffer at pH 7.0.

制大于 30%且依赖其浓度;  $\text{Ni}^{2+}$ 与 *MtDHFR* 作用前后加 EDTA 对 *MtDHFR* 活性抑制大于 60%, 有协同抑制效应 (图 5C)。 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 磁珠中含游离  $\text{Ni}^{2+}$ , 其可能降低固定酶活力且 EDTA 不能逆转。

## 2.4 羧基磁珠固定 *MtDHFR* 及其表征

### 2.4.1 羧基磁珠对酶活测定的干扰

常规方法测定磁珠固定化酶活, 需在固定化酶初速度反应阶段终止反应并分离磁珠, 再测定反应液的吸收变化计算固定化酶活。由于反应终点的确定易产生误差并干扰反应液吸收的测定, 使固定化酶活测定重现性较低, 故需考察不分离磁珠连续监测反应测定酶活的可行性。所用磁珠悬浮稳定性好, 其在有限时段内对 340 nm 消光变化速度影响应该很小。在 1.0 mL 酶反应体系中, 150 mg/L 羧基磁珠、50  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -NADPH 和 50  $\mu\text{mol/L}$  DHF 及其混合物, 在 340 nm 的消光  $A_{340}$  构成恒定本底; 在游离酶存在时, 外加终浓度 75、150、240 mg/L 羧基磁珠, 对光度法跟踪酶反应过程测定游离酶活性无影响。因此, 磁珠对固定酶活测定无显著干扰。本实验限制固定酶磁珠用量, 用光度法连续跟踪测定固定化酶活性。

### 2.4.2 羧基磁珠固定 *MtDHFR* 容量及保留活性

活化羧基磁珠约 600  $\mu\text{g}$ , *MtDHFR* 用量在 5–200  $\mu\text{g}$  之间, 固定化容量基本不变 (图 6); 最大固定化蛋白量约 5.2  $\mu\text{g}$ , 对应固定化容量为  $(8.6\pm 0.6)$  mg/g 磁珠 ( $n=3$ )。不分离磁珠, 连续跟踪固定化酶反应过程并测定固定化酶活性, 所得固定化酶表观比活保留比例变化如图 6 所示。在约 600  $\mu\text{g}$  活化羧基磁珠中, 加入 *MtDHFR* 量从 5–200  $\mu\text{g}$  进行固定时, 磁珠固定化酶表观比活保留比例先增加后逐渐降低至稳定, 在酶用量 10  $\mu\text{g}$  时其表观比活保留 87%, 而酶用量 20–200  $\mu\text{g}$  时磁珠固定化酶表观比活保留比例稳定在 75%。为保留固定酶活性, 选择酶量: 磁珠量比为 1:60。

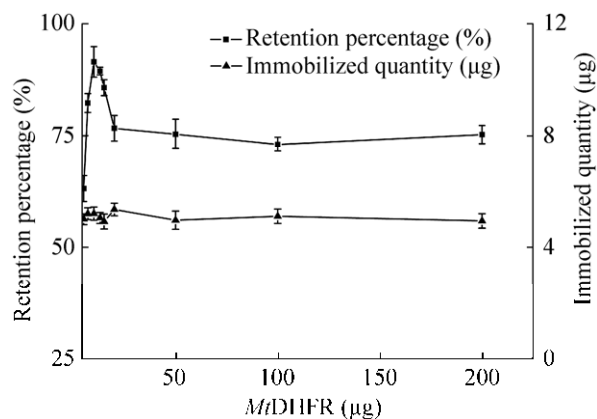


图 6 羧基磁珠固定酶活保留比例及固定化量对加入酶量的响应

Fig. 6 Immobilized quantity and retention percentages of apparent specific activities in response to amounts of enzyme added for immobilization on MSP-COOH-F1.

### 2.4.3 游离和羧基磁珠固定 *MtDHFR* 的储存稳定性

游离和羧基磁珠固定化 *MtDHFR* 在反应缓冲液 0  $^{\circ}\text{C}$  保存 16 h 活性均无显著改变 (图 7); 游离 *MtDHFR* 在 25  $^{\circ}\text{C}$  下反应缓冲液中保存 2 h 后活性持续降低, 4 h 下降超过 10%, 16 h 降低近 60%; 固定化酶 25  $^{\circ}\text{C}$  保存 4 h 活力仅下降 4%, 16 h 下降仅 35%。在混合物库筛选中, 从配体竞争结合固定化酶到磁分离洗涤的全流程, 操作时间不超过 4 h, 故此固定化 *MtDHFR* 稳定性满足混合物筛选要求。

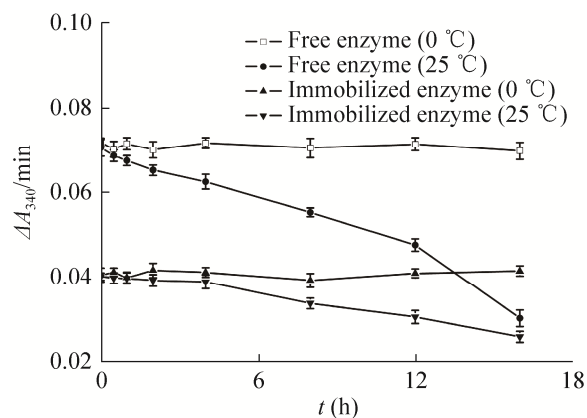


图 7 游离酶和羧基磁珠固定 *MtDHFR* 的稳定性

Fig. 7 Stability of the free and MSP-COOH-F1 immobilized *MtDHFR*.

#### 2.4.4 *Mt*DHFR 羧基磁珠固定前后对 MTX 的 $IC_{50}$

*Mt*DHFR 在羧基磁珠上固定前后对 MTX 的  $IC_{50}$  无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 8), 且都与文献报道结果接近<sup>[25,27]</sup>。可见, 用 MSP-COOH-F1 固定化 *Mt*DHFR 适合筛选其高亲和力抑制剂。

### 3 讨论

本研究构建 N 端带 6×His 标签的 *Mt*DHFR 表达载体 pET28a, 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功重组表达并纯化。比较发现, 不同磁珠固定化重组 *Mt*DHFR 有显著差异。6×His-*Mt*DHFR 通过其 6×His 标签与  $Ni^{2+}$ -NTA 磁珠螯合, 属于位点选择性固定化, 但不适合用于磁分离筛选 *Mt*DHFR 的高亲和力配体。首先,  $Ni^{2+}$ -NTA 磁珠固定化酶保留活性很低。其次,  $Ni^{2+}$ -NTA 螯合带 6×His 标签酶复合物稳定性对 pH 敏感, 在 pH 8.0 及以上螯合酶才能维持固定化状态。但是, 6×His-*Mt*DHFR 在 pH 8.0 时保留的活性很低而不适合筛选其抑制剂。相反, *Mt*DHFR 氨基酸序列仅有 1 个赖氨酸 (Lys-53) 及 N 端伯氨基, 三维结构 (PDB code: 4KNE) 中, 此赖氨酸及其 N 端伯氨基都远离活性位点<sup>[23]</sup>, 可通过伯氨基与磁珠表面羧基生成酰胺

固定化; 这种固定化实际上也属于位点选择性固定化。MSP-COOH-F1 表面为兼性离子对修饰层并带长连接臂的羧基适合固定蛋白, 而磁珠对疏水小分子的非特异吸附弱。优化条件后, 此羧基磁珠固定 *Mt*DHFR 达到  $(8.6\pm 0.6)$  mg/g 磁珠, 特别是固定化酶保留  $(87\pm 4)\%$  活性, 固定前后其对 MTX 的  $IC_{50}$  无显著差异, 而固定化酶在 4 h 内稳定。所以, 用此羧基磁珠固定化 *Mt*DHFR 有望用于配体混合物库中高亲和力配体的选择性富集与筛选。

用 MSP-COOH-F1 羧基磁珠固定化 *Mt*DHFR 时, 磁珠表面羧基活化程度不宜太高, 对设定量磁珠存在最优酶蛋白用量。可能磁珠固定蛋白量少而使位阻小, 有利于固定化酶结合底物。对 MSP-COOH-F1, 酶蛋白量对磁珠量比例接近 1:60, 有利于获得高保留活性固定化酶。MSP-COOH-F1 羧基固定化 *Mt*DHFR 后悬浮稳定性好, 光度法连续监测反应混合物消光 (考虑磁珠对光的散射故称为消光) 适合测定酶活性。

总体而言, 6×His-*Mt*DHFR 适合在大肠杆菌大量表达, 通过成酰胺键固定在 MSP-COOH-F1 上适用于磁分离筛选其抑制剂混合物库。后续工作正在进行中。

### REFERENCES

- [1] Zumla A, George A, Sharma V, et al. WHO's 2013 global report on tuberculosis: successes, threats, and opportunities. *Lancet*, 2013, 382(9907): 1765–1767.
- [2] The World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2018 [EB/OL]. 2018-09-18. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
- [3] Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, 2010, 375(9728): 1830–1843.
- [4] Koul A, Arnoult E, Lounis N, et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 2011, 469(7331): 483–490.
- [5] Chetty S, Ramesh M, Singh-Pillay A, et al. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(3): 370–386.

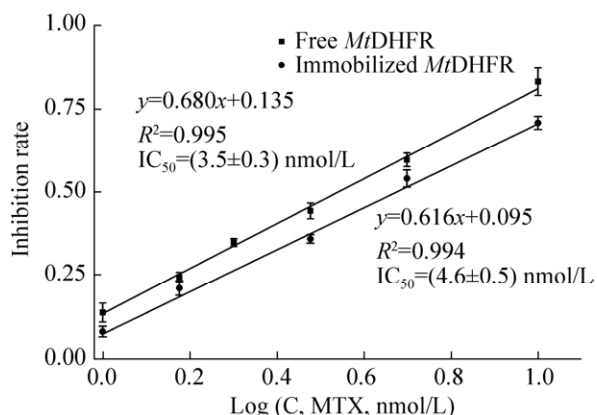


图 8 MTX 对游离酶和羧基磁珠固定 *Mt*DHFR 的  $IC_{50}$   
Fig. 8  $IC_{50}$  of MTX against free and MSP-COOH-F1 immobilized *Mt*DHFR.



- [6] Palomino JC, Martin A. Is repositioning of drugs a viable alternative in the treatment of tuberculosis? *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(2): 275–283.
- [7] Nguyen L, Jacobs MR. Counterattacking drug-resistant tuberculosis: molecular strategies and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012, 10(9): 959–961.
- [8] Sharma M, Chauhan PM. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target for infectious diseases: opportunities and challenges. *Future Med Chem*, 2012, 4(10): 1335–1365.
- [9] Rashid N, Thapliyal C, Chaudhuri P. Dihydrofolate reductase as a versatile drug target in healthcare. *J Proteins Proteomics*, 2016, 7(4): 247–257.
- [10] El-Hamamsy MHRI, Smith AW, Thompson AS, et al. Structure-based design, synthesis and preliminary evaluation of selective inhibitors of dihydrofolate reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(13): 4552–4576.
- [11] Yang X, Wedajo W, Yamada Y, et al. 1,3,5-triazaspiro[5.5]undeca-2,4-dienes as selective *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitors with potent whole cell activity. *Eur J Med Chem*, 2018, 144: 262–276.
- [12] Santa Maria JP Jr, Park Y, Yang LH, et al. Linking high-throughput screens to identify MoAs and novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(9): 2448–2456.
- [13] Bindseil KU, Jakupovic J, Wolf D, et al. Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2001, 6(16): 840–847.
- [14] Su YH, Chiang LW, Jeng KC, et al. Solution-phase parallel synthesis and screening of anti-tumor activities from fenbufen and ethacrynic acid libraries. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(5): 1320–1324.
- [15] Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(10): 4769–4807.
- [16] Annis DA, Nickbarg E, Yang XS, et al. Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11(5): 518–526.
- [17] Macarron R, Banks MN, Bojanic D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(3): 188–195.
- [18] Holdgate GA, Anderson M, Edfeldt F, et al. Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: matching high information content with high throughput. *J Struct Biol*, 2010, 172(1): 142–157.
- [19] Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1582–1614.
- [20] Yang XL, Xie YL, 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. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 44.
- [21] Yang XL, 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. *Microchim Acta*, 2012, 176(1/2): 243–249.
- [22] Yang XL, Hu XL, Chen CY, et al. Comparison of the immobilization of 6His-tagged proteins on magnetic-submicron-particle functionalized with Ni<sup>2+</sup>-NTA and bis-sulfone. *Nanosci Nanotech Lett*, 2015, 7(6): 486–494.
- [23] Dias MVB, Tyrakis P, Domingues RR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. *Structure*, 2014, 22(1): 94–103.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [25] Nixon MR, Saionz KW, Koo MS, et al. Folate pathway disruption leads to critical disruption of methionine derivatives in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol*, 2014, 21(7): 819–830.
- [26] Stone SR, Morrison JF. Kinetic mechanism of the reaction catalyzed by dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1982, 21(16): 3757–3765.
- [27] White EL, Ross LJ, Cunningham A, et al. Cloning, expression, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 232(1): 101–105.
- [28] Cleland WW. The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1967, 29: 1–32.
- [29] Puertas S, Batalla P, Moros M, et al. Taking advantage of unspecific interactions to produce highly active magnetic nanoparticle-antibody conjugates. *ACS Nano*, 2011, 5(6): 4521–4528.

(本文责编 郝丽芳)