

青霉素酰化酶在快速蛋白液相色谱仪上的分离纯化

矫庆华 张启先 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由大肠杆菌 AS1.76 产生的青霉素酰化酶具有水解青霉素 G 产生 6-APA^[1], 水解重排酸产生 7-ADCA 的作用^[2], 并且也具有合成青霉素类或头孢霉素类的作用。为了研究酶的物理化学性质, 我们用 Pharmacia FPLC 系统对比酶进行了分离纯化, 得到了聚丙烯酰胺凝胶电

泳均一的纯酶。本文报道由大肠杆菌 AS1.76 产生的青霉素酰化酶在 FPLC 上分离提纯的过程与结果。

中国科学院微生物研究所技术室吴诚华同志参加了部分工作, 王永力同志在仪器操作方面给与指导, 特此致谢。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 大肠杆菌 *Escherichia coli*. AS1.76 是本组选育出的青霉素酰化酶活力较高的菌株。

2. 试剂: Sephadex G25 为瑞典 Pharmacia 公司的产品; 6-硝基-3-苯乙酰胺基苯甲酸(简称 NIPAB) 为上海生物化学研究所工厂提供。丙烯酰胺为 Sigma 公司产品。其它化学试剂均为市售分析纯。

3. 仪器: 快速蛋白液相色谱仪 (FPLC) 为瑞典 Pharmacia 公司产品, 所用离子交换柱为本公司产 MONO S 和 MONO Q 柱。超声波发生器为通化市无线电元件厂产品。

(二) 方法

1. 酶活力测定

NIPAB 法: 按 Kutzbach^[3] 方法略加改进, 除反应温度为 37°C 外, 方法如前报^[1]。

2. 蛋白质测定: 用 Folin-酚法^[4]。

3. Disc 电泳按 Davis 方法^[5]进行, 凝胶浓度为 7%, 用考马斯亮蓝 R250 染色。

4. 菌体的制备: 培养基成份(%): 鱼肝油 1.0, 苯乙酸 0.2, 玉米浆 0.3, 氯化钠 0.5, pH 7.0, 500ml 三角瓶装 60ml 培养基, 8 磅 30 分灭菌, 接种 23 小时的 AS1.76 斜面菌种, 28°C, 摇床 (170 次/分) 振荡培养 15 小时。于 3278g 离心 40 分钟, 收集菌体, 菌体用生理盐水洗一次置冰箱保存备用。

结 果

(一) 粗酶的提取

称 10g 菌体加 pH5.0、0.05M 醋酸盐缓冲液制成菌悬液, 总体积为 40ml, 置超声波发生器在 150W 处理 4 分钟, 于 14300g 离心 30 分钟, 除去细胞碎片, 上清液加 pH5.0、0.05M 醋酸盐缓冲液定容到 50ml, 加入硫酸链霉素使最终浓度为 0.7%, 于冰箱放置 4 小时, 以 14300g 离心去沉淀, 上清液在搅拌下缓慢加入硫酸铵粉末 12.15g, 使成 40% 饱和度, 放置 4 小时,

再以同样的速度离心 30 分钟, 除去沉淀。上清液中加入 6.6g 硫酸铵粉末, 使成 60% 饱和度, 放置过夜, 于 14300g 离心 30 分钟, 弃去上清, 沉淀用 pH5.0、0.05M 醋酸盐缓冲液溶解定容到 10ml, 即为粗酶液。

(二) Sephadex G25 脱盐

将粗酶液加到预先用 0.05M、pH5.0 醋酸盐缓冲液平衡好的 Sephadex G25(2.2 × 22cm) 中, 并用相同缓冲液洗脱。用 40% 三氯醋酸检查流出液, 共收集 49ml。流速为 0.96ml/分。

(三) MONO S 柱提纯

将如下程序输入电子计算机中。

表 1 MONO S 柱程序

时间(分)	缓冲液 B 的百分浓度	流速 (ml/分)	纸速 (cm/分)	通道
0	0	0.3	0.5	6.1
16.0	70.0	0.3	0.5	
29.0	70.2	0.3	0.5	
29.5	方法结束			

紫外监测灵敏度为 0.5

由于柱子小, 每次上样量不能过大, 因此每次取 1.8—2ml 脱盐后的蛋白液 (共进样品 40.5ml, 加到预先用缓冲液 A (pH5.0, 0.08M 醋酸盐缓冲液) 平衡好的 MONO S 柱中, 用缓冲液 A 和缓冲液 B (0.08M 醋酸盐缓冲液 pH5.0, 内含 0.3M NaCl) 混合梯度洗脱, 当洗脱到 16 分钟时, 缓冲液 B 的浓度占混合洗脱液的 70%, 到 29 分钟时达到 70.2%, 当 29.5 分钟时梯度洗脱完毕。再从进样器加进 1ml 1M NaCl 液, 用缓冲液 A 淋洗, 直至柱内的杂蛋白完全被洗脱出来。结果如图 1。

用 NIPAB 法测定各峰的酶活力。峰 0、1、2、3、4、5、7 均为杂蛋白峰, 峰 6 具有酰化酶活力, 峰 8、9 为加进 1M NaCl 溶液后呈现的杂蛋白峰。把各次分离后的峰 6 样品集中一起共 20ml。峰 6 的样品电泳图谱见图 3。把集中后的峰 6 样品对 pH6.5, 0.02M Tris-HCl 缓冲液透析 24 小时, 透析后的样品继续用 MONO Q 柱提纯。

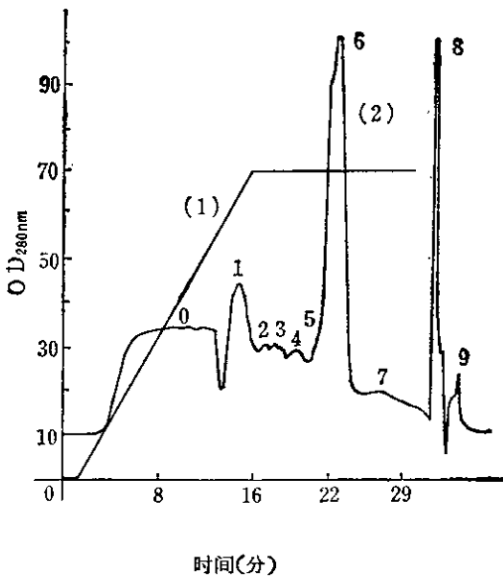


图1 青霉素酰化酶在 MONO S 柱上的洗脱图谱。
(1)梯度洗脱, (2)蛋白吸收光谱 (280nm)。
加样量: 0.968mg 蛋白

(四) MONO Q 柱提纯

将如下程序输入电子计算机中。

表2 MONO Q 柱程序

时间(分)	缓冲液 B 的百分浓度	流速 (ml/分)	纸速 (cm/分)	通道
0	0	0.15	0.5	6.1
10.0	0.0			
35.0	85.0			
40.0	85.2			

紫外监测灵敏度为 0.5

每次取上面透析好的样品液 2ml (共取 10 次, 总进样量为 20ml) 加到预先用缓冲液 B (0.02M pH7.5 Tris-HCl 缓冲液) 平衡好的 MONO Q 柱中, 首先用缓冲液 A 淋洗 10 分钟, 再加入缓冲液 B (0.02M pH7.5 Tris-HCl 缓冲液含 0.2 M NaCl) 混合梯度洗脱, 当洗脱到 35 分钟时缓冲液 B 的浓度占混合洗脱液的 85%, 到 40 分钟时则达到 85.2%, 在 40.5 分钟时, 梯度洗脱完毕, 再从进样器加进 1ml 1M NaCl 液(用缓冲液 A 配制)用缓冲液 A 淋洗, 直至柱内的杂蛋白完全被洗脱出来。结果见图 2。

用 NIPAB 法测定 MONO Q 柱洗脱下来的各峰酶活力, 峰 1、2、4、5 均为杂蛋白峰, 峰 3

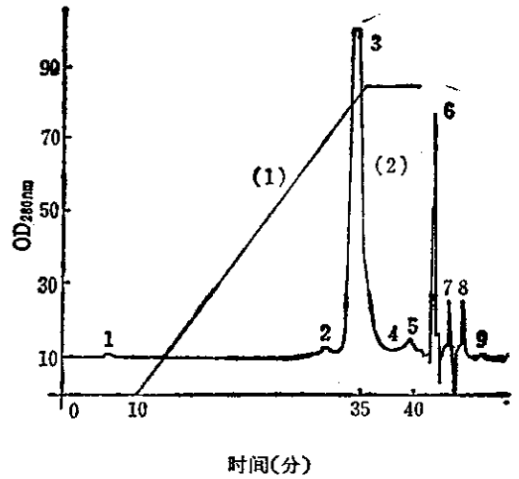


图2 青霉素酰化酶在 MONO Q 柱上的洗脱图谱
(1) 梯度洗脱, (2) 蛋白吸收光谱 (280nm)。
加样量 0.163mg 蛋白。流速 0.15ml/分

具有酰化酶活力, 峰 6、7、8、9 为加进 1M NaCl 液后呈现的杂蛋白峰。把各次分离后的峰 3 集中, 共得 2.5ml 样品。此样品用 Disc 电泳鉴定为均一带, 结果见图 3。

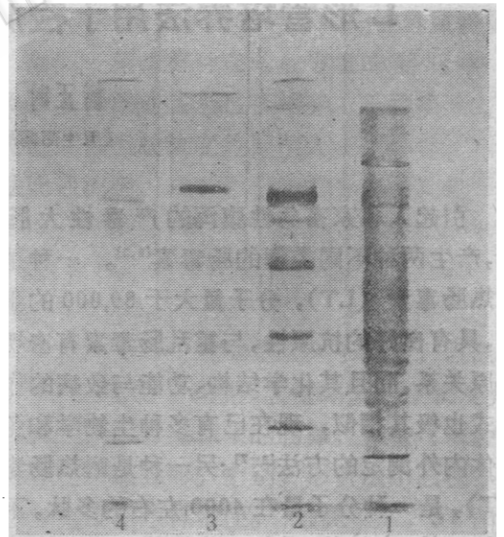


图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳
1.粗酶液, 2. MONO S 柱提纯液,
3,4. MONO Q 柱提纯液

以上各步提纯的结果概括在表 3 中。从图 3 及表中可以看出, 经 FPLC 双柱提纯后, 酶的比活提高接近 80 倍, 而且可获得电泳均一纯酶。

表3 青霉素酰化酶的提纯

提纯步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比活 (u/mg)	回收率(%)	
					蛋白	酶活
破碎细胞抽提液	50	367.5	63.68	0.173	100	100
粗酶液	10	138.0	51.33	0.372	37.550	80.6
Sephadex G25	49	78.2	34.50	0.441	21.300	54.2
MONO S 柱	20	1.63	4.01	2.46	0.440	6.3
MONO Q 柱	2.5	0.135	1.87	13.85	0.037	2.9

讨 论

用快速蛋白液相色谱 (FPLC) 分离酶的优点是省时间。从以上实验结果看, 青霉素酰化酶在 MONO S 柱分离只用 29.5 分钟, 在 MONO Q 柱上分离用 40.5 分钟, 要比一般的离子交换柱分离快几倍到几十倍, 而且重复性好。但加进样品的蛋白量要合适。如果蛋白量过大, 则分离效果降低。另外, 洗脱速度也是十

分重要的, 如果洗脱速度过快, 则分离效果不好。对洗脱剂的离子强度及梯度变化的快慢也直接影响分离效果。

参 考 文 献

- [1] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302—308, 1979。
- [2] 王祯祥等: 微生物学报, 21(4): 477—481, 1981。
- [3] Kutzbach, C. and E. Rauenbusch: Hoppe-soyler's Z. Physiol. Chem., Bd. 354, S. 45—53, Januar 1974.
- [4] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 第 28 页, 科学出版社, 北京, 1979。