

- 使用预编方法模板和搜索功能对分离条件的方便优化
- 用现代化的制备型分离填料和策略纯化设计的快速纯化
- 高度不稳定的酶纯化到“结晶级”纯度的分离

### 摘要

应用ÄKTA<sup>®</sup>FPLC开发了一种用于参与头孢菌素/头霉素生物合成的脱乙酰氧基头孢菌素C合成酶（DAOCS）快速纯化的程序。目的是生产活性酶制备物，用于生成足够纯度的晶体用于X射线衍射分析。DAOCS基因以可溶性的形式过表达在大肠杆菌的细胞质

中。通过自动筛选不同的层析填料和梯度优化开发方法。这通过预编制方法模板十分方便。最终的方法包括Q Sepharose XL的离子交换层析、SOURCE 15ISO的疏水作用层析和Superdex 75 prep grade的凝胶过滤层析。此工艺产生 10 mg纯的活性DAOCS，它被用于结晶和随后的 3D结构测定。

### 介绍

带有活性的高度不稳定蛋白的分离是蛋白质化学中的一个众所周知的难题。这个任务在结构生物学中可能特别具有挑战性，只有具有活性、纯的蛋白制备物才能用于X射线衍射晶体学的研究。全面的纯化策略和各个步骤如何被设计和执行对于决定最终的蛋白制备物的质量是关键的因素。

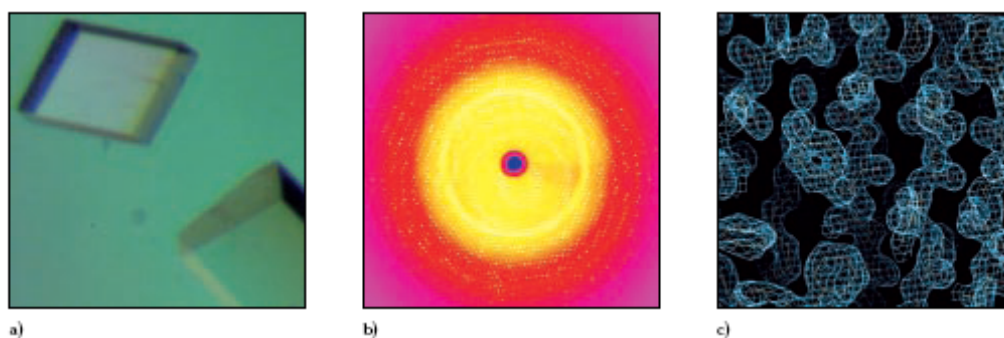


图1.纯化的DAOCS的晶体 (a)、衍射图 (b) 和高分辨率电子密度图 (c)。图由Uppsala, 瑞典农业科学大学分子生物学系的Inger Andersson教授和Anke Terwisscha van Scheltinga博士以及瑞典Uppsala大学生物化学系的Karin Valegård提供。

在这个工作中开发了用于氧敏感酶脱乙酰氧基头孢菌素C合成酶 (DAOCS) 的纯化设计。这种酶催化链霉菌中头孢霉素/头霉素生物合成的一个关键步骤。目前在深入研究下DAOCS属于一类非血红素亚铁依赖的氧酶 (例如见Roach et al, 1997)。

链霉菌属中DAOCS的基因编码被克隆并以可溶性蛋白的形式在大肠杆菌细胞质中表达。早期试验清楚地表明较短的纯化时间能够提高晶体质量,可能是由于减少了氧化修饰的水平。为了减少总的纯化时间,早期的多天纯化程序因此成为这项工作中的主要问题。此应用指南介绍了产生足够质量的DAOCS晶体用于X射线衍射分析的方法开发工作和最终的优化纯化方法。

## 纯化策略和目标

纯化策略总结于图 2。

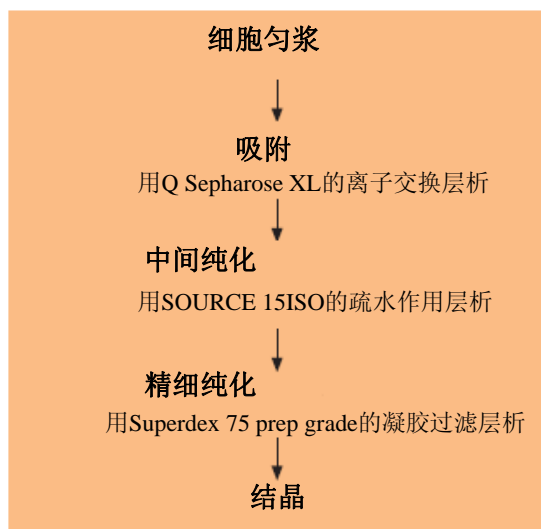


图2.DAOCS纯化策略总结。

确定 3 个目标:

- 获得足够纯度的DAOCS用于结晶和X射线衍射分析, 每批产量为 5-10 mg
- 全部纯化过程可在 1 个工作日内完成
- 

开发的工艺可被放大至少 10 倍

为了快速达到对纯度和产量的要求并利用最简单的可能的设计, 使用下列方法:

- 1) 根据不同的参数 (例如电荷、疏水性和分子大小) 选择分离纯化技术。
- 2) 合理衔接这些技术以便尽可能减少两个纯化步骤之间所需要的样品处理。
- 3) 纯化方案由捕获、中间纯化和精细纯化步骤组成, 且对每个步骤都制定一个特殊的目的。
- 4) 在小 (1 ml) 层析柱上进行用于定性评估的快速筛选。  
在放大的层析柱上完成优化以确保直接放大。
- 5) 缓冲液中含有 DTT 以减少氧化损伤, 且包含 PMSF、苯甲脒和 EDTA 以减少蛋白质降解。

## 结果

### 方法开发

#### 目标蛋白特征

对纯化设计十分重要的 DAOCS 的特性总结在表 1 中。

表 1.DAOCS 的一些特性以及它们对纯化设计的影响。

参数	数值	对纯化设计的影响
等电点	4.8	选择中性 pH 的阴离子交换层析用于捕获
分子量	34500 (Morgan et al, 1994)	选择Superdex 75 prep grade的凝胶过滤层析用于精细纯化
稳定性	氧气敏感: 在与空气接触中失去活性	纯化方案的开发集中于尽可能减少总的纯化时间

## 捕获

在捕获步骤中，主要关注大多数有害的污染物的快速去除（例如蛋白酶）。DAOCS 的表达水平很高，因此非常小体积的细胞匀浆被上样到第一根层析柱上。因此在这个例子中浓缩目标蛋白到一个更容易操作的体积不是一个主要的问题（与大多数其他的捕获捕获情况相比）。

计算的DAOCS等电点（ $pI=4.8$ ）表明在中性pH条件下阴离子交换层析（ALEX）可以作为一个合理的起点用于捕获步骤的开发。AIEX能够极好地用于捕获，因为它是一种快速的、浓缩的技术，在上样到层析柱前仅需要很少的样品处理步骤。使用ÄKTA<sub>FPLC</sub>中预编方法模板对不同的AIEX层析柱（1 ml）进行快速筛选，额外的阀用于层析柱的切换。筛选和优化运行中关于目标蛋白峰的纯度、目标蛋白峰体积和目标蛋白的降解用SDS-PAGE评估。使用PhastSystem进行分析。

应用上述的评估标准，Q Sepharose XL被选择用于进一步的捕获开发。这种填料用于捕获十分理想，因为它具有高载量以及极好的化学和物理稳定性。因此小层析柱可以被用于快速处理大体积样品，且能够应用苛刻的清洗程序。填料也可以被很容易地放大。

层析柱: HiPrep 16/10 Q XL  
样品: 澄清的大肠杆菌抽提液  
样品体积: 40 ml  
Buffer A: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5; 2 mM DTT, 0.2 M 苯甲脒-HCl, 0.2 mM PMSF  
Buffer B: A + 1.0 M NaCl  
流速: 10 ml/min (300 cm/h)  
方法模板: Modified basic\_gr

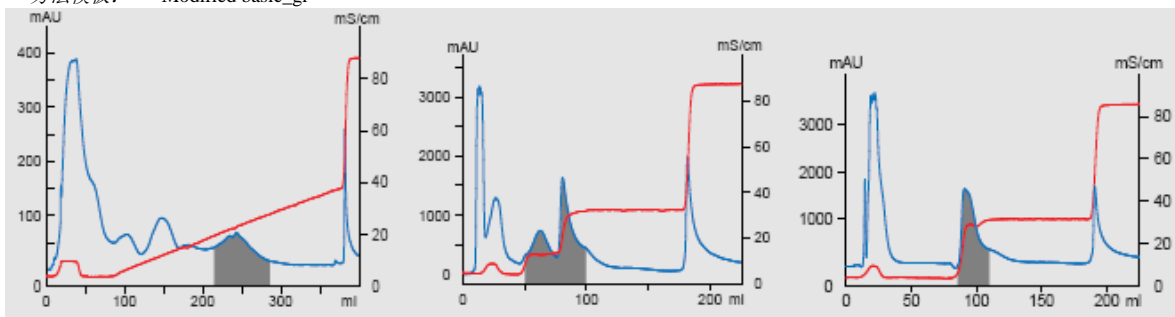


图3.使用HiPrep 16/10 Q XL（20 ml层析柱）用于捕获的梯度形状的优化。真实的梯度形状（电导轨迹）图所示。标记了DAOCS的洗脱位置（阴影部分）。在随后的实验中使用右边层析图的梯度。

预装的HiPrep 16/10 Q XL层析柱（20 ml）被用于梯度优化。层析柱在推荐的最大流速（10 ml/min）下操作。为了尽可能减少峰体积而选择阶段梯度（图3）。所选择的梯度提供最佳纯度的目标蛋白以及最小的目标峰体积。在缓冲液中包含蛋白酶抑制剂混合物，在捕获后（在SDS-PAGE图中）没有观察到目标蛋白的降解。

## 中间纯化

在中间纯化阶段，关注的是尽可能除去剩余的杂质。容量和分辨率是关键的问题。中间步骤纯化的Scouting(摸索实验)运行通过SDS-PAGE进行评估。

疏水作用层析（HIC）是离子交换层析后一种合理的纯化步骤，因为这种组合尽可能减少了两个步骤之间的样品处理（即只需要加入盐）。评估了分别含有乙醚、异丙醇和苯基配基的3根不同的RESOURCE层析柱（含有单分散、15 mm珠子大小、以聚丙烯-二乙烯苯为基础的SOURCE填料的预装层析柱）。筛选层析柱被连接到ÄKTA<sub>FPLC</sub>中的2个PV-908阀门上。选择预编的搜索设计，所有的运行在大约30 min内被自动执行（图4）。SDS-PAGE分析显示RESOURCE ISO（含有SOURCE 15ISO；异丙醇配体）最符合中间纯化阶段的目标。

层析柱: 上图: RESOURCE ISO  
中间: RESOURCE ETH  
下图: RESOURCE PHE  
样品: 从HiPrep 16/10 Q XL收集的DAOCS组分  
样品体积: 10 ml  
Buffer A: 2 M 硫酸铵, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5  
Buffer B: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5  
梯度: 在20 CV内0-100% B  
流速: 3 ml/min  
方法模板: Modified basic\_gr

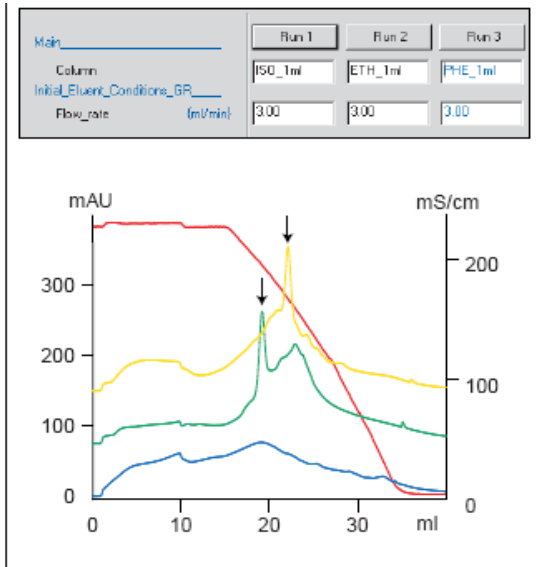


图4.应用 RESOURCE HIC Test Kit 和 ÄKTA<sub>FPLC</sub> 用于中间纯化阶段的 HIC 填料 Scouting 实验。DAOCS 的洗脱位置被标出(箭头)。在 UNICORN 3.0 中的 Scouting 实验也被显示(上面的图)。显示真正的梯度形状(电导轨迹; 红色)。

在Scouting实验(图4)和制备运行(图5b)期间的层析图略微不同,因为在Scouting实验使用2 M硫酸铵(而在制备运行期间使用1.6 M),且使用不同的细胞匀浆液。

SOURCE 15ISO在HR层析柱中被装填到16×50 mm,且在UNICORN 3.0中使用Scouting优化梯度和流速。为了优化目标蛋白峰和邻近的峰之间的分辨率,在这步中牺牲速度(流速被保持在5 ml/min)。在HIC缓冲液中包含甘油,因为甘油被显示能够提高酶回收率。

由HIC分离的含有DAOCS的组分被合并并通过超滤浓缩到适当的体积。

## 精细纯化

选择凝胶过滤用于精细纯化,即去除剩余的污染物。在这种技术中,蛋白根据大小被分离,因此它是先前两种技术(分别根据电荷和疏水性分离)的强有力的补充。使用HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade, DAOCS的分子量(34500)在这个层析柱的最佳分离范围内。

## 优化的方法

在整个纯化过程中样品一直放置在冰上,而且在分部收集期间组分收集器的圆盘一直填满冰块。所有的分离都在室温下完成。

用优化的方法得到的分离结果如图5所示。从收获细胞到从凝胶过滤中收集DAOCS组分的总的纯化时间是5.7小时,其中层析分离的时间小于50%。

从凝胶过滤得到的DAOCS组分含有10.8 mg蛋白,且经过SDS-PAGE和硝酸银染色后可以判断它实际上已经纯化(图5d)。酶活性检测表明它具有活性。纯化的酶马上被浓缩用于结晶试验。得到的晶体在X射线衍射分析中衍射超过1.3 Å(图1)。

## 材料和方法

### 细胞匀浆

通过超声进行细胞破碎。用硫酸链霉素和PEI通过沉淀去除DNA。抽提液通过离心澄清。

### 层析

所有的层析都在ÄKTA<sub>FPLC</sub>上用UNICORN控制完成。系统配有P-920泵、UPC-900监测器、Frac-900组分收集器、pH流动池和pH电极以及2个PV-908阀。

### 电泳

用Multiphor II完成电泳,使用ExcelGel SDS Gradient和银染,并使用PhastSystem

捕获	中间纯化	精细纯化
<b>层析柱:</b> HiPrep 16/10 Q XL	<b>层析柱:</b> SOURCE 15ISO, 装填在HR层析柱中 (16mm×50 mm柱床)	<b>层析柱:</b> HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade
<b>样品:</b> 澄清的大肠杆菌抽提液	<b>样品:</b> 从HiPrep 16/10 Q XL收集的DAOCS组分	<b>样品:</b> 从SOURCE 15ISO收集的DAOCS浓缩后的组分
<b>样品体积:</b> 40 ml	<b>样品体积:</b> 40 ml	<b>样品体积:</b> 3 ml
<b>BufferA:</b> 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5; 2 mM DTT, 0.2 M 苯甲脒-HCl, 0.2 mM PMSF	<b>Buffer A:</b> 1.6 M 硫酸铵, 10% 甘油, 50mMTris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT,0.2 M苯甲脒-HCl, 0.2 M PMSF, pH 7.5	<b>缓冲液:</b> 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 mM 苯甲脒-HCl, 0.2 mM PMSF, pH 7.5
<b>BufferB:</b> A + 1.0 M NaCl	<b>BufferB:</b> 50 mM Tris-HCl, 10% 甘油, 1 mM EDTA, 2 mM DTT,0.2 M 苯甲脒-HCl, 0.2 M PMSF, pH 7.5	<b>流速:</b> 1ml/min (30 cm/h)
<b>梯度:</b> 在5 CV内0% B, 在5 CV内30% B, 在5 CV内100% B (阶段梯度)	<b>梯度:</b> 在4 CV内0-16% B, 在8 CV内16-24% B, 在4 CV内24-35% B, 在4 CV内100% B	<b>方法模板:</b> basic_gr
<b>流速:</b> 10 ml/min (300 cm/h)	<b>流速:</b> 5 ml/min (150cm/h)	
<b>方法模板:</b> Modified basic_gr	<b>方法模板:</b> Modified basic_gr	

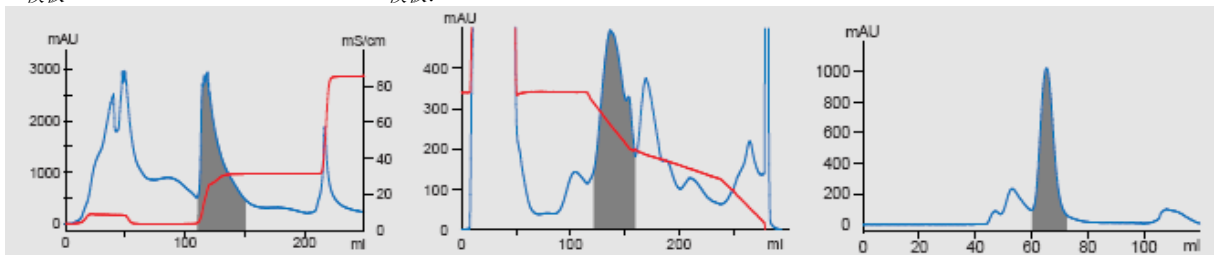
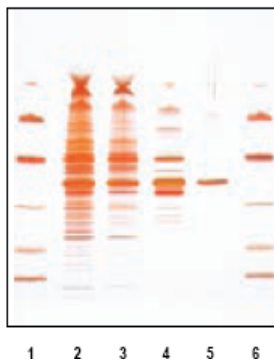


图5. DAOCS使用ÄKTA<sub>FPLC</sub>的完整的、优化的纯化方案。DAOCS的洗脱位置被显示(阴影)。a)使用AIEX捕获。b)使用HIC的中间纯化。c)使用凝胶过滤的精细纯化。真实的梯度如a)和b)所示(电导轨迹; 红色)。



- 泳道1,6: LMW Marker Kit。
- 泳道2: 细胞匀浆液
- 泳道3: Q Sepharose XL 收集的DAOCS组分
- 泳道4: SOURCE 15ISO 收集的DAOCS组分
- 泳道5: Superdex 75 pg 收集的组分

图5d). DAOCS纯化的SDS-PAGE和银染分析。

## 参考文献

略

## 缩写词

- AIEX: 阴离子交换层析
- CV: 柱体积
- DTT: 二巯苏糖醇
- DAOCS: 脱乙酰氧基头孢菌素C合成酶
- RDTA: 乙二胺四乙酸
- HIC: 疏水作用层析
- PEI: 聚乙烯亚胺
- PMSF: 苯甲基磺酰氟
- SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳