

单克隆抗体亲和层析法纯化重组溶葡萄球菌酶

黄晋江¹, 吴宏宇¹, 张继恩¹, 黄青山²

1 上海高科联合生物技术研发有限公司, 上海 201206

2 复旦大学生命科学学院遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 溶葡萄球菌酶能够特异性杀灭金黄色葡萄球菌且不易产生耐药性, 有望成为治疗葡萄球菌属细菌引发感染的特效药物。为获得高纯度的重组溶葡萄球菌酶以达到药用标准, 本研究构建了一种以重组溶葡萄球菌酶单克隆抗体为配体的亲和层析纯化方法。纯化后的重组溶葡萄球菌酶纯度大于 95%, 得率大于 90%, 即使重复使用 30 多次, 纯化效率不变。且经比色法鉴定纯化后的重组溶葡萄球菌酶仍具有良好的活性。该方法步骤简单, 纯化效果好, 为生产高纯度重组溶葡萄球菌酶奠定了基础。

关键词: 溶葡萄球菌酶, 单克隆抗体, 亲和层析

Purification of recombinant lysostaphin by monoclonal antibody affinity chromatography

Jinjiang Huang¹, Hongyu Wu¹, Jien Zhang¹, and Qingshan Huang²

1 Shanghai Hi-tech United Bio-technological Research & Development Co. Ltd, Shanghai 201206, China

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Lysostaphin, a specific endopeptidase enzyme derived from *Staphylococcus aureus*, is a bactericidal agent against *Staphylococcus* and difficult to be drug-resistant. This study established the monoclonal antibody affinity chromatography to obtain lysostaphin of high purity for drug-use standard. The purified Lysostaphin was of > 95% purity and its recovery rate more than 90%. Moreover, the affinity column kept its efficiency of purification invariable after more than 30 times repeat. Also, the dye release assay validated that the purified lysostaphin had significant bactericidal activity. This method was simple and of high efficacy for the lysostaphin purification and showed its potency in commercial production.

Keywords: lysostaphin, monoclonal antibody, affinity chromatography

溶葡萄球菌酶 (Lysostaphin) 来源于 *Staphylococcus simulans* biovar *stathyliticus* ATCC1362 葡萄球菌分泌于胞外的肽链内切酶^[1]。可以裂解葡萄球菌肽聚糖的“甘氨酸五肽”键, 使得细菌溶胀裂解死亡^[1,2]。由于溶葡萄球菌酶的这种直接破坏细胞壁结构的杀菌机理, 各种葡萄球菌属细菌 (包括 MRSA、VRSA) 都几乎不能通过变异等方式对

其产生耐药性, 有望成为治疗葡萄球菌属细菌引发感染的特效药物。

国内上海高科联合生物技术研发有限公司申报的重组溶葡萄球菌酶已经获得国家食品药品监督管理局的治疗用第 1 类生物制品临床试验批文 (批件号 2005L03961), 目前正在进行临床试验。为了满足 SFDA 对药物品质的要求和进行溶葡萄球菌酶结构方

Received: June 20, 2008; Accepted: November 13, 2008

Corresponding author: Qingshan Huang. Tel: +86-21-58994611; E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

面的研究的需要,尽可能提高溶葡萄球菌酶的纯度十分必要。

起初,溶葡萄球菌酶的分离纯化主要借助于常规生化方法,包括盐析、离子交换和分子筛层析等技术^[3-5]。这些方法操作复杂、步骤繁琐、纯化效率不高、产率和纯度都较低^[5]。近年来,国内外报道了一些使用亲和层析法纯化葡萄球菌酶的研究报告,主要包括:以藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)的细胞壁肽聚糖与CNBr活化的Sephrose4B偶联作为吸附介质的亲和层析^[6];以金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖(PG)偶联于CNBr活化的Sephrose4B作成亲和吸附介质用以纯化溶葡萄球菌酶^[7];采用壳聚糖作为载体,与酶作用的特异底物(细菌菌体细胞)固定化,作为吸附介质纯化溶葡萄球菌酶^[8]。这类纯化方法都是利用酶与底物间的特异性反应来达到纯化目的。虽然可以达到较高的纯度,但由于配体经几次纯化后基本降解,无法反复进行纯化,不能在生产中应用。

本研究主要利用抗原抗体间专一性结合的特点,在成功获得溶葡萄球菌酶单克隆抗体的基础上建立了以溶葡萄球菌酶的单克隆抗体为配体的亲和层析专一纯化溶葡萄球菌酶。用这一方法制备的溶葡萄球菌酶的纯度大于95%,活性回收率超过90%。即使重复使用30多次,纯化效率不变。20%乙醇4℃贮藏下柱效可达半年。有望运用于溶葡萄球菌酶的高纯度制备与大规模生产。

1 材料和方法

1.1 材料

单克隆抗体由本实验室制备,兔抗鼠二抗购于华美公司,Sephrose4B、protein A 预装柱购自Pharmacia公司,SOURCE 5RPC ST4.6/150 色谱柱购自 Amersham 公司。其他的化学试剂均为国产。实验过程中的缓冲液都经过0.45 μm 的滤膜过滤。层析系统 AKTA explorer 100、紫外分光光度计 Ultrospec 3300 pro、蛋白质电泳仪为 GE 公司产品。冷冻干燥机 Alpha 2-4 为德国 Christ 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 溶葡萄球菌酶单克隆抗体的制备与纯化

实验共获得6株可表达抗溶葡萄球菌酶单克隆抗体的杂交瘤细胞株:A1G5A1、A2C1D10、L1F3、

L5H3、L5A9 和 L4A5,分别注射入 BalB/c 小鼠腹腔获得腹水,实验方法参照文献^[9]。腹水经过 protein A 柱纯化,结合条件为 0.1 mol/L Tris · HCl pH 8.0,洗脱条件为 0.1 mol/L pH 2.8 Gly-HCl,在收集管中预先加入 1/10 体积 1 mol/L Tris · HCl pH 8.0 的中和液,透析后冷冻干燥,-20℃ 保存。经 ELISA 检测,选择亲和力最强的 L1F3 株用以制备亲和层析介质。

1.2.2 亲和层析柱的制备

采用碱性条件下活化 Sepharose4B^[10]。用蒸馏水冲洗数次,再用 0.1 mol/L pH 8.3 碳酸盐缓冲液冲洗 2 次,随后用少量碳酸盐缓冲液将胶洗入烧杯,冰浴搅拌,同时以 100 mg: 1 mL Sepharose4B 凝胶的比例加入 CNBr (100 mg:mL 蒸馏水溶解),活化 10 min,并不时用 2 mol/L NaOH 中和使 pH 始终保持在 11,待 pH 值不再变化,维持 10 min。用大量冰水冲洗至中性再用 0.1 mol/L pH 8.3 含 0.5 mol/L NaCl 碳酸盐缓冲液迅速洗涤 90 s,抽滤至半干,立即准备偶联。

将 30 mg 冻干粉(含 7.3 mg 单克隆抗体)溶于缓冲液并缓慢加入胶(CNBr 活化 Sepharose4B)中,室温下轻柔搅拌 1 h。偶联后,以 500 mL 偶联缓冲液于烧结玻璃漏斗中对胶进行清洗除去未结合的蛋白,随后将胶置于 0.1 mol/L Tris · HCl pH 8.3 中封闭活性位点 2 h。用 0.1 mol/L Tris · HCl pH 8 含 0.5 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 pH 4 含 0.5 mol/L NaCl 交替洗涤 3 个循环。最后在 Tris · HCl 体系下将胶装入 1 cm×10 cm 柱中,柱体积为 3.5 mL。收集偶联过程中各步洗脱液,通过 Lowry 法测定蛋白含量,既而计算偶联率。

1.2.3 亲和层析

重组溶葡萄球菌酶发酵生产过程参考文献^[11]。将含溶葡萄球菌酶基因的球形芽孢杆菌培养上清液依照中国专利 CN1743453 的制备方法经阳离子交换初步纯化,洗脱液经透析和冷冻干燥,所得冻干粉中酶含量约 100 U/mg,纯度大于 60%。

将 15 mg 冻干粉样品用 0.02 mol/L Tris · HCl 缓冲液(pH 8.0)溶解至 1 mL 上样,用 0.02 mol/L Tris · HCl 缓冲液(pH 8.0)以 1 mL/min 的流速平衡亲和层析柱,洗涤并收集未吸附的蛋白,待再次平衡后以 0.1 mol/L NaCl 进行洗脱,收集蛋白峰冷冻干燥^[12,13]。

1.2.4 溶葡萄球菌酶的纯度鉴定

1) SDS-PAGE 电泳分析: 将待分析的蛋白质样品加入等体积 2×SDS-PAGE 样品处理液 (2×SDS-PAGE 样品缓冲液: 20% SDS 10 mL, 0.2% 溴酚蓝 0.1 g, 20% 甘油 10 mL), 100°C 水浴 3~5 min。冷却点样, 在电泳槽中加入 Tris · Gly pH 8.3 电泳缓冲液, 恒流条件下电泳 (浓缩时 13 mA, 分离时 25 mA), 置于 0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色液中振荡染色过夜, 以异丙醇: 冰乙酸: 蒸馏水体积比 1:1:8 染色液进行脱色。

2) 高效液相色谱(HPLC)纯度分析: 将样品加入 SOURCE 5RPC ST4.6/150 色谱柱后, 启动设定的洗脱程序进行洗脱。

1.2.5 溶葡萄球菌酶的活性测定

溶葡萄球菌酶活性测定方法参照文献[14]进行, 以偶联艳蓝染料的葡萄球菌细胞壁为色源底物的比色法(定义一个活性单位为金黄色葡萄球菌悬浊液在 37°C pH 7.5 的条件下反应 10 min, 在 595 nm 波长下的吸光值从 0.250 降至 0.125)。以美国 Sigma 公司生产的溶葡萄球菌酶为标准品绘制酶标准曲线。

1.2.6 免疫亲和柱的稳定性和可重复性检测

1) ELISA 法检测亲和柱的抗体脱落: 参照黄青山等^[15]建立的抗体夹心酶联免疫吸附法建立了单抗的间接 ELISA 检测方法并绘制了检测标准曲线, 然后以此曲线作为标准检测收集峰中的单克隆抗体的含量。包被抗原为 0.2 μg/mL 的溶葡萄球菌酶, 一抗为待测收集液, 其他依据间接 ELISA 标准操作进行。

2) 免疫亲和柱的可重复性试验: 按照文中 1.2.3 的亲亲和层析方法重复进行 50 次溶葡萄球菌酶亲和和层析试验或者活性回收率降低至 50% 以下。并对每次纯化中的收集峰进行抗体脱落检测和溶葡萄球菌酶的活性测定。

2 结果

2.1 单克隆抗体纯化

取 15 mL 小鼠腹水, 采用 AKTA explorer 100 纯化系统以 1 mL/min 的流速通过 protein A 亲和层析柱。纯化后的洗脱峰通过 SDS-PAGE 电泳检验显示: 经过 protein A 柱纯化, 腹水中大部分杂蛋白均被除去, 抗体纯度在 95% 以上 (图 1)。

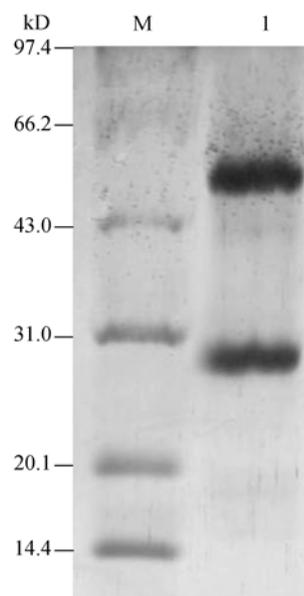


图 1 单克隆抗体 L1F3 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the monoclonal antibody (mAb) L1F3. M: protein maker; 1: mAb L1F3 purified by protein A (with DTT).

2.2 抗体偶联效率测定

对上步纯化的抗体洗脱峰进行冻干处理, 与 3 mL CNBr 活化的 Sepharose4B 进行偶联, 通过 Lowry 法测定各步骤洗涤液的蛋白含量。计算出偶联于凝胶上的总蛋白量与单抗总用量的比值, 即为偶联率。偶联过程共加入 7.3 mg 抗体, 洗涤液中的蛋白含量为 2.52 mg, 计算得到偶联率为 65.4%。

$$\text{偶联率} = (7.3 - 2.52) \times 100 / 7.3 = 65.4\%$$

2.3 溶葡萄球菌酶亲和层析

取 15 mg 样品冻干粉, 用上样缓冲液溶解至 1 mL, 采用 AKTA explorer 100 纯化系统以 1 mL/min 的流速通过上述制备的单克隆抗体偶联 CNBr 活化 Sepharose4B 亲和柱用以纯化溶葡萄球菌酶, 层析结果见图 2。

经过多次摸索, 发现采用 0.02 mol/L Tris · HCl pH 8.0 作为结合条件可有效分离多数杂蛋白同时又保证溶葡萄球菌酶的结合。起初主要采用改变 pH 值 (pH 2.8) 的方法进行洗脱, 洗脱后的溶葡萄球菌酶由于低 pH 的影响, 导致降解片段较多, 纯化效果不是很理想。后经改变离子强度和 pH 的组合方式, 尽量保持较高的洗脱时的 pH 值, 结果纯化效果非常理想。

溶葡萄球菌酶的分子量为 26 kD, 电泳样品经单克隆抗体(L1F3)柱纯化。对电泳胶进行扫描, 纯度达到 95.6%(表 1)。

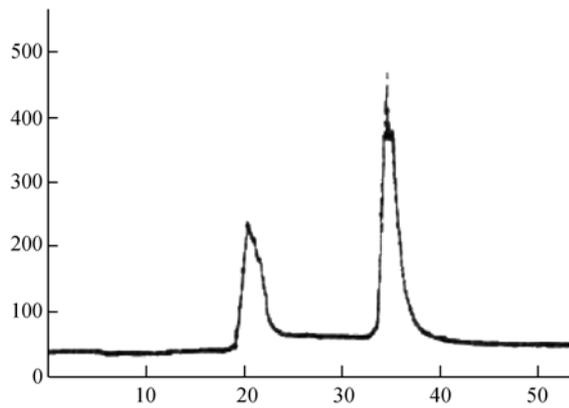


图 2 溶葡萄球菌酶亲和层析图谱

Fig. 2 Purification of recombinant lysostaphin. One milliliter lysostaphin was applied into the immunoaffinity column with 0.02 mol/L Tris · HCl, pH 7.4 then washed with 0.1 mol/L NaCl, pH 7.0.

2.4 SDS-PAGE 电泳

经 SDS-PAGE 电泳鉴定溶葡萄球菌酶纯度, 结果见图 3。

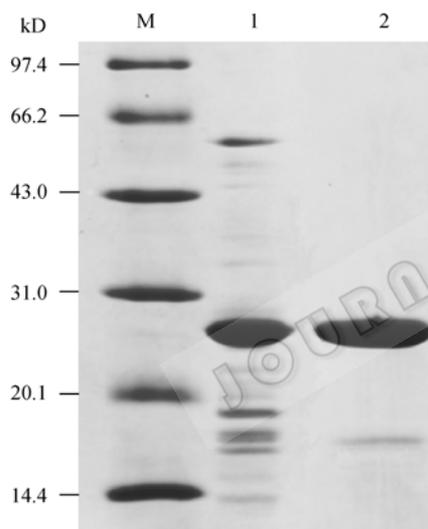


图 3 纯化溶葡萄球菌酶电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant lysostaphin. M: protein maker; 1: Lysostaphin purified by cation exchange chromatography 2: Lysostaphin purified by L1F3 affinity column.

表 1 SDS-PAGE 电泳纯度检验

Table 1 Result of scanned SDS-PAGE

No.	Integral (%)	Peak (%)	Density (%)
1	95.6	43.1	17.2
2	4.4	3.1	1.4

2.5 高效液相色谱(HPLC)纯度分析

HPLC 对溶葡萄球菌酶进行纯度分析, 结果见

图 4。除上样峰外, 样品呈单一峰且只有轻微波动, 峰形与标准品对应性良好。纯度大于 95%。

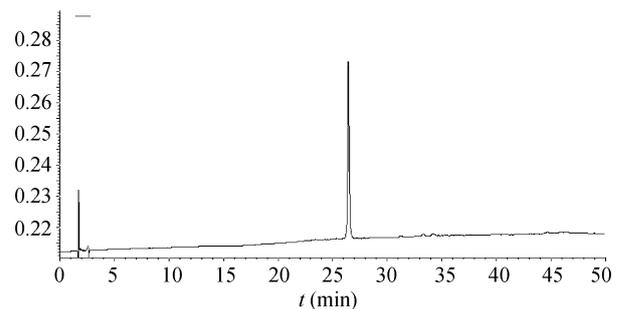


图 4 重组溶葡萄球菌 HPLC 层析图谱

Fig. 4 HPLC analysis of purified recombinant lysostaphin. Solution A: 0.005% TFA+10% methyl cyanide+ddH₂O, B: 0.05% TFA+80% methyl cyanide+ddH₂O. Sample was applied in a 20 μL injection with solution A and washed with 0% B 10min then 0%–60% B 20min next 60%–100% B 10 min end 100% B 10 min.

2.6 溶葡萄球菌酶活性鉴定

采用色源底物比色法。以 Sigma 公司进口的溶葡萄球菌酶标准品(720 U/mg 稀释至 9 U/mL)绘制酶标准曲线, 并以蛋白质浓度 C 对光密度值 A 进行回归分析。经测定 15 mg 样品(溶解至 1 mL)的 $A_{595}=0.62$, 计算得总酶活为 1246 U(样品经 1800 倍稀释); 测得洗脱液的 $A_{595}=0.48$, 经计算得洗脱液总酶活为 1146 U(洗脱液经 180 倍稀释), 回收率为 92%。

2.7 免疫亲和柱的稳定性和可重复性检测

根据所绘制的间接 ELISA 法标准曲线求得最低检测限为 0.022 μg/mL, 检测收集峰中的单克隆抗体含量, 结果均为阴性。由于本研究所建立的间接 ELISA 检测法灵敏度不是很高, 不能完全排除抗体脱落的情况, 还应开发出更加灵敏的检测方法。好在抗体的分子量和溶葡萄球菌酶相比要大的多, 比较容易通过分子筛进行分离。

在对免疫亲和柱进行 40 次的重复性检测试验中, 直至第 33 次重复试验, 纯化效率基本不变。活性回收率稳定在 90%以上, 至第 38 次, 活性回收率依然可以达到 70%, 但到第 45 次活性回收率已低于 50%。

3 讨论

本研究建立的利用单克隆抗体作为亲和配体来纯化溶葡萄球菌酶的方法制备溶葡萄球菌酶的纯度大于 95%, 得率大于 90%。与其他以酶与底物原理

构建的溶葡萄球菌酶亲和纯化方法相比, 具有纯化效果好、纯化效率高、柱效长等优点, 为生产高纯度重组溶葡萄球菌酶奠定了基础。

我们制备了以球形芽孢杆菌表达的重组溶葡萄球菌酶免疫产生的单克隆抗体为配基的亲介质, 既而以该介质分别纯化不同表达载体(球形芽孢杆菌和大肠杆菌)产生的重组溶葡萄球菌酶并比较, 后者获得了较高的纯度。这种现象有待进一步深入研究。

纯化过程中, 最初采用低 pH 值的洗脱方式, 获得了较高纯度的溶葡萄球菌酶。考虑到该酶在低 pH 值下不稳定, 既而我们采用温和 pH 条件下提高离子强度的洗脱方式, 获得了更高的纯度, 且该条件下得到的样品也更加易于后序处理。

经 Western blotting 检验, 纯化后的电泳杂条带同样成阳性。推测可能原因如下: 根据 Thumm 等研究发现, 溶葡萄球菌酶是由 N 端开始降解的^[16], 而我们制备的单克隆抗体可能是针对溶葡萄球菌酶中间部分或者是 C 端抗原决定簇的, 导致纯化过程中具有相应抗原决定簇的降解片段也可以与抗体结合, 影响了纯度。因此, 如果构建融合蛋白(仅包含溶葡萄球菌酶 N 端的一个抗原决定簇)制备单克隆抗体, 用这种单克隆抗体制备的亲介质来纯化即可避免降解片段结合, 从而可获得更高纯度的溶葡萄球菌酶。

REFERENCES

- [1] Schindler CA, Schuhardt VT. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, **51**: 414–421.
- [2] Climo MW, Ehlert K, Archer GL. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45**(5): 1431–1437.
- [3] Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning sequence and expression of the Lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(5): 1127–1131.
- [4] Zhang PD, Yang Jun, Shao XG, *et al.* Cloning and expression of lysostaphin gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Ind Microbiol*, 1989, **19**(6): 1–6.
张培德, 杨军, 邵旭光, 等. 溶葡萄球菌酶在大肠杆菌和枯草杆菌中的克隆与表达. *工业微生物*, 1989, **19**(6): 1–6.
- [5] Zhou RQ, Ma L, Zhang PD. Purification and properties of lysostaphin. *Chin Biochem J*, 1989, **19**(6): 1–6.
- [6] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
- [7] Zhang PD, Ma L, Chen SG. Purification of lysostaphin by affinity chromatography. *Ind Microbiol*, 1992, **21**(5): 1–5.
张培德, 马力, 陈石根. 溶葡萄球菌酶的亲和层析分离. *工业微生物*, 1992, **21**(5): 1–5.
- [8] Zhou YB, Zhang PD. Purification of enzyme through affinity chromatography using chitosan as ligand carrier. *Ind Microbiol*, 2002, **32**(1): 19–22.
周毅彬, 张培德. 用壳聚糖替代 Sepharose 4B 固定相关配体纯化酶的研究. *工业微生物*, 2002, **32**(1): 19–22.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 855–856.
- [10] Guo SQ, Zhao HY. Studied on immobilizing cholinesterase with sepharose activated by CNBr at two different pH. *Chin Biochem J*, 1995, **11**(2): 239–242.
郭胜清, 赵华月. 两种 CNBr 活化 Sepharose 固定化胆碱酯酶的方法与研究. *生物化学杂志*, 1995, **11**(2): 239–242.
- [11] Zhou RQ, Zhang PD. Study on the fermentation of lysostaphin. *J Fudan Univer (Nat Sci)*, 1991, **30**(3): 293–296.
周润琦, 张培德. 溶葡萄球菌酶的发醇生产. *复旦大学学报(自然科学版)*, 1991, **30**(3): 293–296.
- [12] Tseng CF, Huang HY, Yang YT, *et al.* Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, 2004, **33**: 265–273.
- [13] Yueh CH, Lai YA, Chen WL, *et al.* An improved method for haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 purification using monoclonal antibody affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J Chromatogr B*, 2007, **845**: 210–217.
- [14] Zhou R, Chen S, Recsei P. A dye release assay for determination of lysostaphin activity. *Anal Biochem*, 1988, **171**(1): 50–53.
- [15] Huang QS, Zhang JE, Wu HY, *et al.* Detection of recombinant lysostaphin using antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(1): 117–121.
黄青山, 张继恩, 吴宏宇, 等. 抗体夹心酶联免疫吸附法测定重组溶葡萄球菌酶研究. *生物工程学报*, 2007, **23**(1): 117–121.
- [16] Thumm G. Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol Microbiol*, 1997, **23**(6): 1251–1265.