

表面偶极离子亲水磁珠固定化异柠檬酸裂解酶及其表征

段昌园, 姜雪, 曾宏威, 杨晓兰*

(重庆医科大学 检验医学院, 重庆 400016)

摘要: 比较两种亲水磁珠固定化结核分枝杆菌异柠檬酸裂解酶 (*Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase, *MtICL*)并优化,为天然产物中 *MtICL* 先导抑制剂的亲和富集筛选提供适用的固定化酶。构建 6×His-pET28a-*ICL*,经 *E.coli* BL21(DE3)重组表达、Ni²⁺-NTA 柱纯化和酶学性质表征获得 *MtICL*(重组蛋白质)。用羧基功能化和 Ni²⁺-NTA 功能化制备两种表面偶极离子亲水磁珠固定化 *MtICL*,比较其固载量、酶活力、稳定性及对已知抑制剂的响应。羧基磁珠固定化酶表观保留比活显著高于 Ni²⁺-NTA 固定化酶。当羧基磁珠与重组蛋白质加样质量比为 60:1 时,固定化酶表观保留比活可达游离酶的 85%,此时羧基磁珠对 *MtICL* 表观固载量为 (7.2±0.2) mg/g(以磁珠质量计, *n*=3)。羧基磁珠固定化 *MtICL* 对衣康酸的亲和力与游离酶无显著差异(*P*>0.05),且稳定性更强。此羧基磁珠固定化 *MtICL* 可望作为磁分离、亲和富集筛选天然产物中 *MtICL* 抑制剂类抗结核先导化合物。

关键词: 结核病;异柠檬酸裂解酶;亲水磁珠;酶固定化

中图分类号:Q 814 文章编号:1673-1689(2024)01-0020-09 DOI:10.12441/spyswjs.20210906001

Immobilization of Isocitrate Lyase on Amphoteric Ion-Rich Hydrophilic Magnetic Beads and Its Characterization

DUAN Changyuan, JIANG Xue, ZENG Hongwei, YANG Xiaolan*

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To provide magnetic immobilized *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase (*MtICL*) suitable for affinity-driven enrichment screening of *MtICL* lead inhibitors from natural products, two hydrophilic magnetic beads were compared for immobilization of *MtICL* under the optimized conditions. *MtICL* was obtained via expression of recombinant 6×His-pET28a-*ICL* plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) and purification with Ni²⁺-NTA agarose column followed by characterization of enzymatic properties. Two amphoteric ion-rich hydrophilic magnetic beads, functionalized with carboxyl and Ni²⁺-NTA, were used to immobilize *MtICL*, respectively, for comparing their immobilization quantity, enzymatic activity, stability, and affinities for the known inhibitors. The apparent retention specific activity of carboxyl magnetic beads-immobilized *MtICL* was significantly higher than that of Ni²⁺-NTA magnetic bead-immobilized *MtICL*. When the mass ratio of carboxyl

收稿日期: 2021-09-06 修回日期: 2021-11-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82273900);重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2019jcyj-msxmX0166)。

* 通信作者: 杨晓兰(1968—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事蛋白质配体设计合成、高通量筛选与分离分析材料等研究。

E-mail: xiaolanyang666@cqmu.edu.cn

magnetic beads to protein was optimized to 60:1, the apparent retention activity of the immobilized enzyme reached 85% of that of the free enzyme. The apparent saturated immobilization capacity of carboxyl magnetic beads for *MtICL* was (7.2 ± 0.2) mg/g (calculated by magnetic beads weight, $n=3$). There was no significant difference in the affinity of carboxyl magnetic bead-immobilized *MtICL* for itaconic acid compared to that of free *MtICL* ($P>0.05$), and the stability was stronger. *MtICL* immobilized on carboxylic magnetic beads is suitable for the magnetic separation, affinity-driven, enrichment, and screening of *MtICL* inhibitors as anti-tuberculosis lead ligands from natural products.

Keywords: tuberculosis, isocitrate lyase, hydrophilic magnetic beads, enzyme immobilization

目前,结核病的发病率虽已下降,但日益增加的耐药菌,尤其是多药耐药(MDR)和超级耐药(XDR)结核分枝杆菌,给结核病治疗带来了巨大的挑战^[1]。另外,结核分枝杆菌被巨噬细胞吞噬后,可在巨噬细胞内乏氧和碳源缺乏下进入生长静止的休眠状态,在宿主免疫力低下时大量生长,成为继发性结核的潜在来源。而现有抗结核药物对休眠期结核分枝杆菌无作用。

异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, ICL)是乙醛酸循环的关键限速酶^[2],也参与了甲基柠檬酸循环。乙醛酸循环和甲基柠檬酸循环对以脂肪酸或胆固醇为首选碳源的休眠期结核分枝杆菌的存活至关重要^[3-4],而 ICL 催化的乙醛酸循环在宿主细胞中并不存在^[5-6]。有研究表明,*MtICL* 在乏氧环境的结核分枝杆菌中高表达^[7];敲除 *MtICL* 基因的结核分枝杆菌滞留性和毒力降低^[8]。因此,*MtICL* 是清除休眠期结核分枝杆菌的理想药物靶点^[3]。早期的 ICL 抑制剂结构类似于底物异柠檬酸或产物琥珀酸和乙醛酸,包括衣康酸(itaconic acid, IA)^[9]、3-溴丙酮酸(3-bromopyruvic acid, 3-BP)^[10]、3-硝基丙酸(3-nitropropionic acid, 3-NP)^[11]。目前仍未有针对 ICL 抑制剂类药物进入临床^[12]。以 *MtICL* 为靶点的化合物库^[13-14]和天然产物库^[15]通过高通量筛选获得潜在抑制剂,但抑菌作用不理想;对 465 种中药提取物筛选获得针对 *MtICL* 的 IC_{50} 低于 0.05 mg/mL 的两种提取物,但其实际活性成分未知。故针对天然产物中 *MtICL* 抑制剂结构的发现具有重要意义,但急需有效可靠的方法。

天然产物中活性成分往往含量很低,现有混合物筛选方法包括亲和层析、配体捕获、亲和电泳、磁分离筛选,以及荧光偏振和表面等离子共振等^[16-18],但对于筛选天然产物中微量活性成分的作用有限^[19]。固定化酶具有稳定性强、重复性好、易于分离等特

点,已广泛应用于天然产物的抑制剂筛选^[20-22]。作者所在课题组前期建立的基于磁珠固定靶蛋白亲和迭代筛选方法^[23-24],可望发现复杂混合物中极低含量的有效成分,已初步成功应用于组合合成小库的高亲和力配体发现。为探索适用于亲和富集筛选的磁珠固定化 *MtICL* 靶酶,本研究中选用的两种亲水磁珠 MSP-NTA(Ni²⁺-NTA 磁珠)和 MSP-COOH-F1(羧基磁珠),其表面含大量两性基团,具有亲水性,对疏水小分子和蛋白质的非特异结合均较低(见图1)^[25],比较两种磁珠固定化 *MtICL* 并优化,以期获得迭代筛选所需固定化 *MtICL*,为最终实现天然产物中 *MtICL* 抑制剂的发现打下基础。

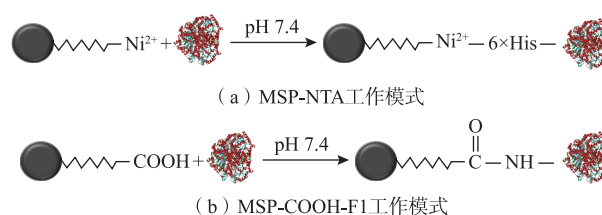


图1 磁珠固载蛋白质示意图

Fig. 1 Diagram of immobilization of protein on magnetic beads

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组质粒 6xHis-pET28a-*ICL* 委托中美泰和生物技术有限公司构建;大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)、硫酸卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、咪唑、2-吗啉乙磺酸(MES)、三羟甲基氨基甲烷(Tris):北京鼎国昌盛生物技术有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠:重庆泽恒生物科技有限公司;镍离子琼脂糖凝胶层析介质:GE Healthcare 公司;NADH:北京索莱宝科技有限公司;异柠檬酸:Acros 公司;LDH:Sigma 公司;3-吗啉丙磺酸(MOPS)、IA:Adamas-beta 公司;羧基磁珠(MSP-COOH-F1)、

Ni²⁺-NTA 磁珠(MSP-NTA):重庆博蓝鹰生物技术有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC):上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组蛋白质的表达纯化 将携带目的基因的重组质粒 6×His-pET28a-ICL 转入至感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3)中培养,单克隆测序鉴定。蛋白质表达纯化方案参考文献[26]。镍离子琼脂糖凝胶层析柱纯化重组蛋白质。洗杂液为含有 10、40 mmol/L 的咪唑缓冲液,洗脱液为含 500 mmol/L 的咪唑缓冲液。用 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4),通过 Millipore 氮气正压(0.15~0.20 MPa)超滤浓缩洗脱 3 次至 5 mL 左右。纯化产物用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度,120 g/L SDS-PAGE 分析蛋白质纯度。

1.2.2 重组蛋白质的酶学性质表征

1)酶活力测定 参考文献[26]并适当修改。300 μL 的反应体系中含有 50 mmol/L 的 MOPS 缓冲液(含 5 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L L-半胱氨酸、1 mmol/L EDTA, pH 6.8)、2 mmol/L 的异柠檬酸和一定量的纯化重组蛋白质,混匀后于 37 °C 孵育 20 min,添加 2 U LDH 和 0.2 mmol/L 的 NADH,混匀后在室温于 340 nm 波长下间隔 10 s 监测 3 min 内的吸光度减少值。底物 NADH 的消光系数为 6.22 L/(mmol·cm),按照以下公式计算酶活力^[2]。

$$E_a = \frac{\Delta A \times V_T}{t \times \varepsilon \times L \times V} \times D \quad (1)$$

式中: E_a 为酶活力, U/mL; ΔA 为吸光度的减少值; t 为反应时间, min; ε 为 NADH 的消光系数, L/(mmol·cm); L 为比色皿光径, 本文中为 1 cm; V_T 为反应总体积, mL; V 为测定时样品所用体积, mL; D 为样品稀释倍数。

2)最适 pH 测定 配制 pH 4.0~10.0 的 MOPS 缓冲液,测定酶活力,并以吸光度的改变速率 v 表征酶活力。以 pH 和改变速率 v 作图,得出最适 pH,为后续的磁珠固定和混合物筛选提供最适反应 pH。

$$v = \frac{\Delta A}{t} \quad (2)$$

式中: v 为吸光度改变速率, min⁻¹; ΔA 为吸光度减少值; t 为反应时间, min。

3)重组蛋白质质量浓度与活性关系 于 300 μL 的酶反应体系中加入不同终质量浓度的重组蛋白

质(0.004~0.040 g/L),以改变速率 v 和重组蛋白质质量浓度作图,获得线性范围。

4)米氏常数测定 改变底物异柠檬酸终浓度(0.1~1.0 mmol/L),分别测定 *MtICL* 酶活力。以改变速率 v 的倒数 $1/v$ 和底物浓度 S 的倒数 $1/S$ 作图,确定 *MtICL* 对底物异柠檬酸的表观 K_m 。

5)游离酶对抑制剂 3-BP 的响应 配制 0~20 mmol/L 的 3-BP 母液。在 300 μL 的反应体系中,加入 10 μL 的 3-BP 和适量游离酶,37 °C 孵育 10 min 后加入底物再次孵育 20 min,后续步骤同 1.2.2 中的酶活力测定。以 3-BP 对 *MtICL* 的抑制率和 3-BP 的终浓度对数值作图,用软件 Origin 2018 拟合抑制率与 3-BP 终浓度对数值响应曲线,并计算 3-BP 对游离酶的 IC₅₀。

1.2.3 重组蛋白质 MSP-NTA 固定及表征 取 MSP-NTA 悬液(100 g/L),磁力去上清液,用固定缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)洗涤 3 次后重悬至 7 g/L。将不同质量重组蛋白质用固定缓冲液重悬至 40 μL,缓慢滴入 10 μL 的磁珠悬液,加完后立即温和混匀以免团聚;于冰上以 200 r/min 速率固定 30 min,期间每隔 8~10 min 颠倒混匀一次;磁分离保留上清液,磁珠用固定缓冲液洗涤 3 次后再次重悬至 7 g/L,冰上保存备用。重组蛋白质加入质量与上清液中重组蛋白质质量相减可得磁珠固载量($n=3$),并通过最高固载量求得磁珠表观固载量。

$$C = \frac{m_1}{m_0} \quad (3)$$

式中: C 为 MSP-NTA 的表观固载量; m_1 为最高固载量, mg; m_0 为磁珠加入量, g。

1)MSP-NTA 固定化酶活力表征 300 μL 反应体系中加入 70 μg 磁珠固定化酶,与底物在 37 °C 孵育 20 min,磁分离取上清液测酶活力,根据实际固定化酶量求得磁珠固定化酶表观保留比活,同时与未加磁珠的等量游离酶比活相比求得磁珠固定化酶的相对表观保留比活。

2)金属离子对游离酶活力的影响 100 μL 的酶反应缓冲液中加入不同终浓度的 Ni²⁺、Fe³⁺(0~20 nmol/L)和一定量的 *MtICL*,于冰水浴中混合振摇 30 min 后,取 1/10 加入 300 μL 的酶反应体系中,后续步骤同 1.2.2 中的酶活力测定。

1.2.4 重组蛋白质 MSP-COOH-F1 固定及表征 取 MSP-COOH-F1 悬液(20 g/L),用 pH 6.0 的 20

mmol/L 的 MES 缓冲液洗涤 3 次,磁力去上清液,加入 EDC、NHS(25 g/L,溶于 pH 6.0 的 20 mmol/L 的 MES 缓冲液)各 100 μ L,室温持续混合振摇 30 min。磁力去上清液,加入预冷至 0 $^{\circ}$ C 的 pH 7.4、20 mmol/L 的 MES 缓冲液重悬至 6 g/L。重组蛋白质用 pH 7.4、20 mmol/L 的 MES 缓冲液重悬至 100 μ L,振荡的情况下将 100 μ L 磁珠悬液缓慢滴入重组蛋白质溶液中,冰上混合反应 30 min。磁分离保留上清液,磁珠用 pH 7.4、20 mmol/L 的 MES 缓冲液洗涤 3 次并重悬至 12 g/L,0 $^{\circ}$ C 保存备用。固载量及表观保留比活测定同 1.2.3,并与 MSP-NTA 的固载量和表观保留比活比较。

重组蛋白质 MSP-COOH-F1 固定化前后对抑制剂 IA 的响应:300 μ L 的反应体系中,加入不同终浓度的 IA(10.0~170.0 μ mol/L)和适量磁珠固定化酶或游离酶,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,后续步骤包括数据处理同 1.2.2 中的游离酶对 3-BP 抑制剂的响应。

1.2.5 游离 *MtICL* 和磁珠固定化 *MtICL* 的稳定性 将游离酶用 MOPS 缓冲液稀释 10 倍,两种磁珠固定化酶分别于 25 $^{\circ}$ C 室温和 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中静置保存,每隔一段时间测其吸光度改变速率 v ,以改变速率 v 和时间作图,考察游离酶和两种磁珠固定化酶在不同温度下的稳定性。

1.3 数据处理

每个实验重复 3 次,使用软件 Origin 2018 处理数据,结果以平均值 \pm 标准差表示。统计学分析采用软件 SPSS 25.0,固定化酶前后的 IC_{50} 采用配对样本 T 检验分析, $P<0.05$ 为具有统计学差异。

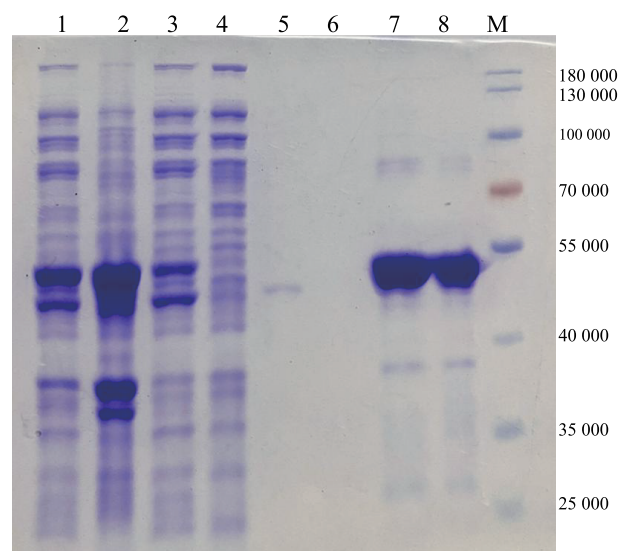
2 结果与分析

2.1 重组蛋白质的表达和纯化

重组质粒 6 \times His-pET28a-*ICL* 转化后单克隆菌经测序比对发现,与 GenBank 中结核分枝杆菌(H37Rv)碱基序列 Rv0467 一致,对应氨基酸序列同源性达 100%。*MtICL* 表达纯化后,在相对分子质量 50 000 处有一条明显的目标蛋白质条带(见图 2),纯度较高,满足磁珠固定化要求。纯化蛋白质总收率约为 50 mg/L(以 LB 培养基体积计)。

2.2 重组蛋白质的酶学性质表征

异柠檬酸裂解酶可催化异柠檬酸生成琥珀酸和乙醛酸,而乙醛酸在 LDH 和 NADH 的作用下,还原生成甘醇酸酯,通过实时监测 NADH 在 340 nm



1. 裂解液;2. 沉淀;3. 上清液;4. 穿透液;5. 10 mmol/L 咪唑洗杂液;6. 40 mmol/L 咪唑洗杂液;7. 500 mmol/L 咪唑洗脱液;8. 纯酶;M:Marker。

图 2 *MtICL* 的表达

Fig. 2 Expression of *MtICL*

处吸光度(A)的减少,取线性范围内吸光度变化速率,按底物(NADH)消光系数确定酶活力。按照方法 1.2.2 中测定 *MtICL* 酶活力,并计算 *MtICL* 的比活为 (350.0 ± 10.0) mmol/(min \cdot g)。

MtICL 在 pH 4.0~10.0 的 MOPS 缓冲液中测定其最适 pH(见图 3),发现其在 pH 7.4 时活性最高(以吸光度的改变速率 v 来间接表征酶活力的变化趋势)。故后续磁珠固定和混合物筛选缓冲液采用 pH 7.4。

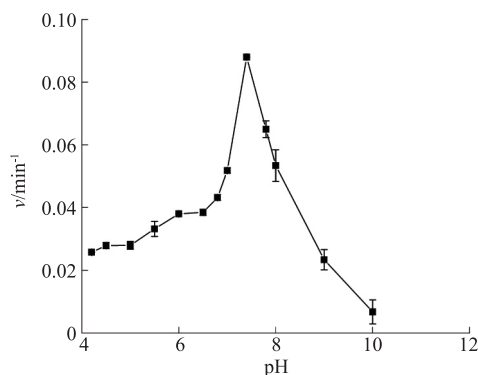
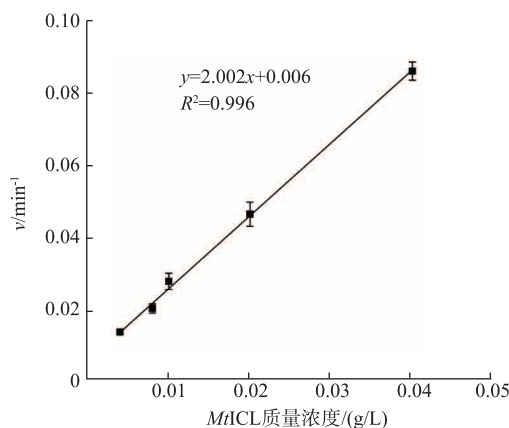
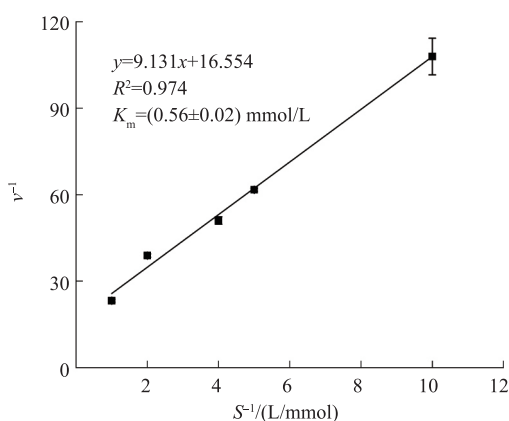


图 3 *MtICL* 酶活力的 pH 效应

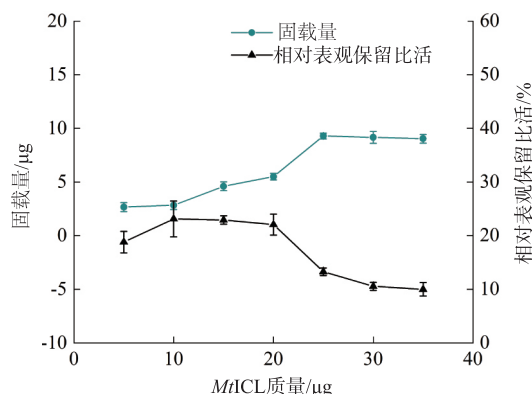
Fig. 3 Effect of pH on enzymatic activity of *MtICL*

在一定酶质量浓度范围内,测得的酶改变速率与加入的酶质量浓度成正比,在 0.004~0.040 g/L 呈线性响应(见图 4)。根据双倒数作图法求得底物异柠檬酸的表观 K_m 为 (0.56 ± 0.02) mmol/L(见图 5)。

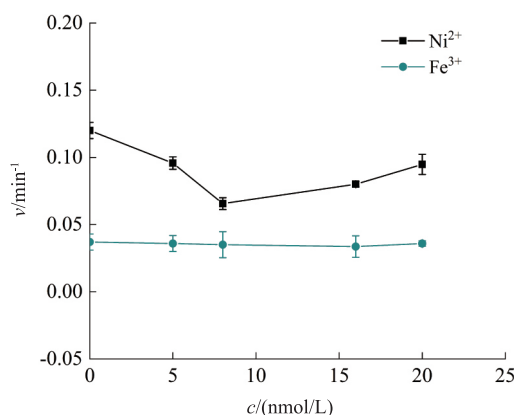
图4 *MtICL* 改变速率对酶质量浓度响应Fig. 4 Response of reaction rate to concentration of *MtICL*图5 *MtICL* 对异柠檬酸的表观 K_m Fig. 5 Apparent K_m of *MtICL* to isocitrate

2.3 MSP-NTA 固定 *MtICL* 及表征

MSP-NTA 加入量为 70 μg , 当重组蛋白质加入量从 5 μg 增加到 35 μg 时, 固载量逐步增加并达到平衡 (见图 6)。在重组蛋白质加入量为 25 μg 时, 固载量达到饱和, 最高固载量约为 9.3 μg , 由此可得 MSP-NTA 磁珠表观固载量为 (132.8 ± 3.9) mg/g (以磁珠质量计, $n=3$)。固定化酶的相对表观保留比活在重组蛋白质加入量为 5~20 μg 时仅约 20%, 当重组蛋白质加入量增加到 25 μg 时, 酶活力显著下降。在重组蛋白质加入量为 10 μg 时达到最高表观保留比活, 为游离酶的 23%, 此时的表观固载量为 (40.4 ± 1.7) mg/g (以磁珠质量计, $n=3$)。可见, MSP-NTA 的固载量较高, 但是酶活力保留却很低, 可能是磁珠悬液中游离的金属离子 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 对酶活力产生影响。

图6 MSP-NTA 固定 *MtICL* 的固载量和相对表观保留比活Fig. 6 Immobilization quantity and relative apparent retention specific activity of *MtICL* on MSP-NTA

经实验发现 (见图 7), 金属离子浓度在 0~20 nmol/L 时, Fe^{3+} 对 *MtICL* 酶活力基本无影响, 而 Ni^{2+} 却明显抑制酶活力。在 Ni^{2+} 浓度为 8 nmol/L 时, 对 *MtICL* 的酶活力抑制达 45%。由此可知, 导致固定化酶酶活力下降的主要原因可能是固定化体系中游离的二价镍离子^[27]。

图7 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 对 *MtICL* 酶活力影响Fig. 7 Effects of Ni^{2+} and Fe^{3+} on enzymatic activity of *MtICL*

2.4 MSP-COOH-F1 固定 *MtICL* 及表征

2.4.1 MSP-COOH-F1 固定 *MtICL* 固载量及表观保留比活 如图 8 所示, 活化 MSP-COOH-F1 的加入量为 600 μg , 重组蛋白质加入量在 0~200 μg 时, 磁珠固载量逐渐增加。当重组蛋白质加入量为 250 μg 时, 达到饱和固载, 即 600 μg 活化磁珠的最大固载量约为 9.5 μg , 计算磁珠表观固载量约为 (15.8 ± 1.0) mg/g (以磁珠质量计, $n=3$)。随着重组蛋白质加入量的增加, 表观保留比活逐渐降低。在重组蛋白

质加入量为 10 μg 时,表观保留比活最高,约为游离酶的 85%,此时的表观固载量为 (7.2 ± 0.2) mg/g (以磁珠质量计, $n=3$)。M₁ICL 的活性位点结合口袋较小,底物小分子不易有效到达活性位点^[28],当重组蛋白质加入量增多时,磁珠表面可能偶联了多个蛋白质,蛋白质大分子之间的空间位阻阻碍了底物进入蛋白质活性中心,使得酶活力下降。与 MSP-NTA 相比,MSP-COOH-F1 的表观固载量较低,但固定化酶表观保留比活明显优于前者。为了使固定化酶在后续的应用中有最大的保留酶活力,采用 MSP-COOH-F1 固载重组蛋白质,且控制重组蛋白质与磁珠投料质量比为 1:60。

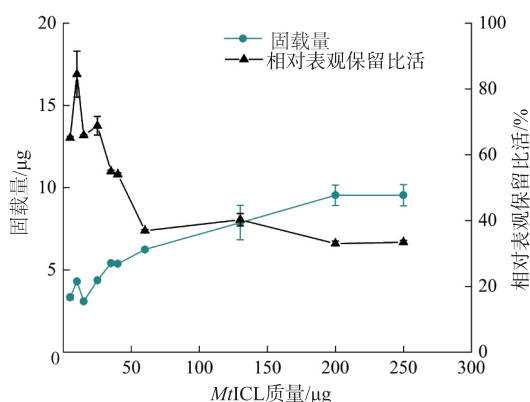
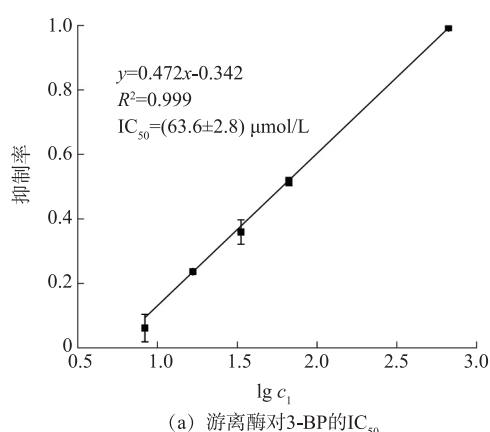


图 8 MSP-COOH-F1 固定 M₁ICL 的固载量和相对表观保留比活

Fig. 8 Immobilization quantity and relative apparent retention specific activity of M₁ICL on MSP-COOH-F1



(a) 游离酶对 3-BP 的 IC₅₀

c_1 : 3-BP 浓度 ($\mu\text{mol/L}$); c_2 : IA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)。

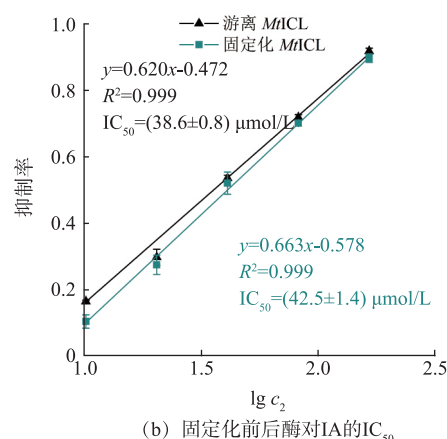
2.4.2 M₁ICL 固定化前后对抑制剂的响应 游离酶对抑制剂 3-BP 和 IA 的 IC₅₀ 分别为 (63.6 ± 2.8) 、 (38.6 ± 0.8) $\mu\text{mol/L}$ ($n=3$, 见图 9)。MSP-COOH-F1 固定化 M₁ICL 对 IA 的 IC₅₀ 为 (42.5 ± 1.4) $\mu\text{mol/L}$ ($n=3$, 见图 9(b)), 与游离酶相比无显著差异 ($P>0.05$), 且与文献报道相符^[29]。

2.5 游离 M₁ICL 和磁珠固载 M₁ICL 的稳定性

混合物筛选中,为了实现基于亲和力的配体捕获,需要保证固定化酶的酶活力稳定。作者所在课题组建立的迭代筛选方法中磁珠和重组蛋白质的固定化过程是 30 min,前后处理过程约 2 h。因此,分别考察固定化酶和游离酶在不同温度下的稳定性。游离酶在 0 $^{\circ}\text{C}$ 、4 h 活性下降 5%, 25 $^{\circ}\text{C}$ 活性显著下降 (见图 10(a))。MSP-COOH-F1 固定化酶在 0 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 18 h 内活性无显著变化 (见图 10(b))。而 MSP-NTA 固定化酶在 0 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 时 2 h 内活性分别下降 8%、44% (见图 10(c))。故 MSP-COOH-F1 固定化酶的稳定性明显优于 MSP-NTA 固定化酶和游离酶。

3 结 语

通过构建 N 端带 6×His 标签的 M₁ICL 表达载体 pET28a, 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达并纯化, 获得表达量、纯化率及酶比活均较高的 M₁ICL, 可望实现大量可溶表达, 满足磁珠固定化并采用迭代筛选体系筛选天然产物对蛋白质质量的要求。对比两种磁珠对 M₁ICL 的固载量、表观保留比活及稳定性发现, MSP-NTA 表面修饰有 Ni²⁺, 可通过 M₁ICL 上的



(b) 固定化前后酶对 IA 的 IC₅₀

图 9 MSP-COOH-F1 固定化酶和游离酶对抑制剂的响应曲线

Fig. 9 Responing curve of MSP-COOH-F1 immobilized enzyme and free enzyme to inhibitors

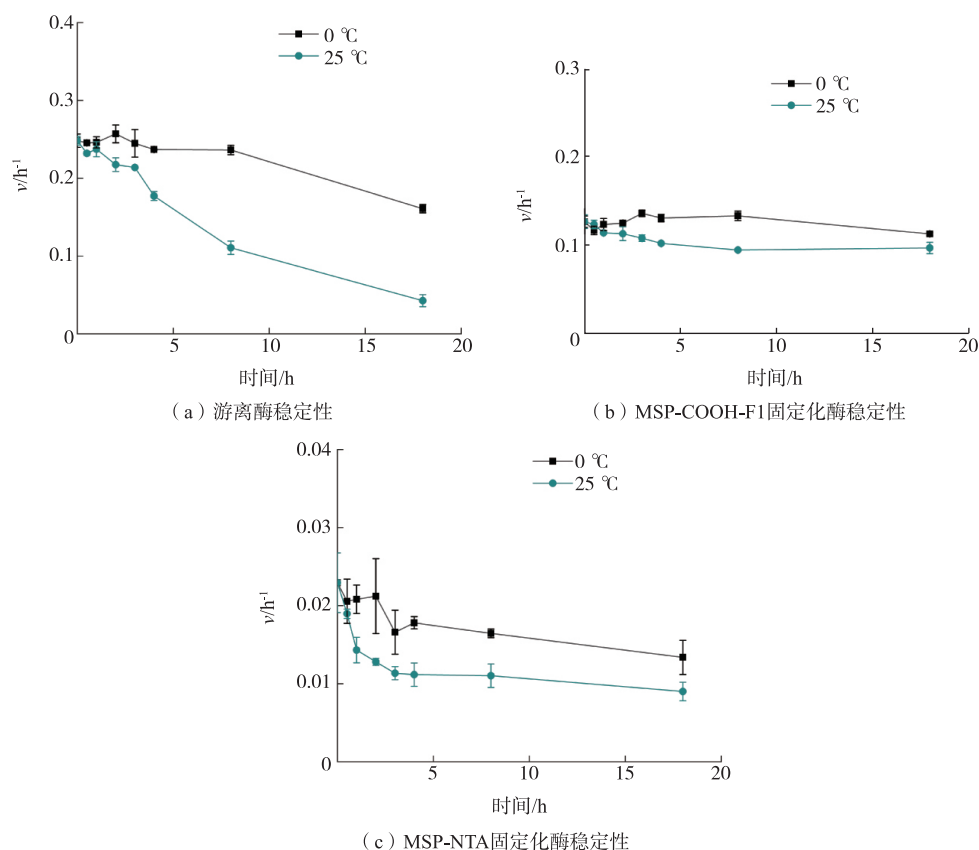


图 10 游离酶和固定化酶稳定性

Fig. 10 Stability of the free and immobilized enzymes

6×His 标签选择性地固定蛋白质(见图 1(a)),表观固载量约是 MSP-COOH-F1 的 8 倍,而表现保留比活却显著下降,在 25 °C 放置 2 h 酶活力下降 44%。共价结合固定化酶是目前应用最广泛的固定化酶方法之一^[30]。MSP-COOH-F1 表面修饰的羧基官能团,经过 EDC 和 NHS 活化后,可与蛋白质表面的游离氨基形成酰胺键而共价固定化(见图 1(b))。*MtICL* 由 4 个相同的亚基组成,其晶体结构(PDB: 1F8M)显示,表面分布有 28 个赖氨酸残基,活性位点内部无赖氨酸残基。因此,理论上羧基磁珠固定化 *MtICL* 不会影响 *MtICL* 酶活力。通过对 MSP-COOH-F1 固定化体系的优化,其表观固载量可达 (15.8 ± 1.0) mg/g(以磁珠质量计),相对表现保留比活最高为 85%。MSP-COOH-F1 固定化 *MtICL* 在 0 °C 和 25 °C 下保存 18 h,酶活力无显著改变,相对表现保留比活及稳定性均满足迭代筛选要求。此

外,*MtICL* 用 MSP-COOH-F1 固定化前后对抑制剂 IA 的 IC_{50} 也无显著差异。

亲和迭代指数富集筛选方法的应用依赖于大量的固定化酶,而 MSP-COOH-F1 固定化 *MtICL* 达到最高表现保留比活时表观固载量仅有 (7.2 ± 0.2) mg/g(以磁珠质量计),而基于 6×His 标签的固定化可大大提高 *MtICL* 的固载量,但因金属离子镍对保留酶活力的潜在影响,后续可考虑更换靶酶融合标签。作者所在课题组报道了 GST 标签的亲和标记试剂^[31],将其修饰于磁珠表面便可实现磁珠对 GST 标签融合酶的固定化,此基于标签的磁珠固定化策略有望提高固载量的同时保留最高酶活力。

综上所述,相比于 MSP-NTA 通过金属螯合固定,MSP-COOH-F1 的共价修饰固定 *MtICL* 的效果更优,适用于天然产物中 ICL 抑制剂的亲和富集筛选。

参考文献:

[1] FARIDGOHAR M. Finding new ways to combat multidrug-resistant tuberculosis[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2020, 26(1):

71-80.

- [2] IBEJI C U, SALLEH N A M, SUM J S, et al. Demystifying the catalytic pathway of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase [J]. **Scientific Reports**, 2020, 10(1):18925.
- [3] BHUSAL R P, BASHIRI G, KWAI B X C, et al. Targeting isocitrate lyase for the treatment of latent tuberculosis [J]. **Drug Discovery Today**, 2017, 22(7):1008-1016.
- [4] QI N, SHE G L, DU W, et al. *Mycobacterium smegmatis* GlnR regulates the glyoxylate cycle and the methylcitrate cycle on fatty acid metabolism by repressing *icl* transcription [J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12:603835.
- [5] MAHESH H B, SHIRKE M D, WANG G L, et al. In planta transcriptome analysis reveals tissue-specific expression of pathogenicity genes and microRNAs during rice-*Magnaporthe* interactions [J]. **Genomics**, 2021, 113(1):265-275.
- [6] DOLAN S K, WELCH M. The glyoxylate shunt, 60 years on [J]. **Annual Review of Microbiology**, 2018, 72:309-330.
- [7] SAXENA A, SRIVASTAVA V, SRIVASTAVA R, et al. Identification of genes of *Mycobacterium tuberculosis* upregulated during anaerobic persistence by fluorescence and kanamycin resistance selection [J]. **Tuberculosis**, 2008, 88(6):518-525.
- [8] MUÑOZ-ELÍAS E J, MCKINNEY J D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence [J]. **Nature Medicine**, 2005, 11(6):638-644.
- [9] MCFADDEN B A, PUROHIT S. Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1977, 131(1):136-144.
- [10] KO Y H, MCFADDEN B A. Alkylation of isocitrate lyase from *Escherichia coli* by 3-bromopyruvate [J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1990, 278(2):373-380.
- [11] SCHLOSS J V, CLELAND W W. Inhibition of isocitrate lyase by 3-nitropropionate, a reaction-intermediate analogue [J]. **Biochemistry**, 1982, 21(18):4420-4427.
- [12] LEE Y V, WAHAB H A, CHOONG Y S. Potential inhibitors for isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* and non-*M. tuberculosis*: a summary [J]. **BioMed Research International**, 2015, 2015:895453.
- [13] LIU Y S, ZHOU S, DENG Q, et al. Identification of a novel inhibitor of isocitrate lyase as a potent antitubercular agent against both active and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* [J]. **Tuberculosis**, 2016, 97:38-46.
- [14] LEE Y V, CHOI S B, WAHAB H A, et al. Applications of ensemble docking in potential inhibitor screening for *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase using a local plant database [J]. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2019, 59(5):2487-2495.
- [15] BAI B, XIE J P, YAN J F, et al. A high throughput screening approach to identify isocitrate lyase inhibitors from traditional Chinese medicine sources [J]. **Drug Development Research**, 2006, 67(10):818-823.
- [16] HOU X F, SUN M, BAO T, et al. Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2020, 10(10):1800-1813.
- [17] TSAI H Y, HSIEH C C, CHANG Y C, et al. Quick screening of true tyrosinase inhibitors from natural products using tyrosinase-immobilized magnetic nanoparticles and a magnetic microplate: Part II melanogenesis bioactivity [J]. **Journal of the Chinese Chemical Society**, 2021, 68(12):2290-2293.
- [18] CHEN L D, LYU D Y, WANG S Z, et al. Surface plasmon resonance-based membrane protein-targeted active ingredients recognition strategy: construction and implementation in ligand screening from herbal medicines [J]. **Analytical Chemistry**, 2020, 92(5):3972-3980.
- [19] FU Y W, LUO J Y, QIN J A, et al. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products [J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2019, 168:189-200.
- [20] CHRONOPOULOU E G, VAROTSOU C, GEORGAKIS N, et al. Ligand fishing: an approach for the discovery of inhibitors from complex biological mixtures [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2020, 2089:235-243.
- [21] ZHAO Y M, WANG L H, LUO S F, et al. Magnetic beads-based neuraminidase enzyme microreactor as a drug discovery tool for screening inhibitors from compound libraries and fishing ligands from natural products [J]. **Journal of Chromatography A**,

- 2018, 1568: 123-130.
- [22] LI L, FAN M L, LI Y N, et al. A rapid strategy for screening high-efficiency PCSK9 inhibitors from *Ginkgo biloba* leaves by ligand fishing, HPLC-Q-TOF-MS and interdisciplinary assay[J]. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2020, 28(2): 273-282.
- [23] YANG X L, XIE Y L, 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[J]. **BMC Biotechnology**, 2011, 11: 44.
- [24] YANG X L, 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[J]. **Microchimica Acta**, 2012, 176(1/2): 243-249.
- [25] YANG X L, HU X L, CHEN C Y, et al. Comparison of the immobilization of 6×His-tagged proteins on magnetic-submicron-particle functionalized with Ni²⁺-NTA and bis-sulfone[J]. **Nanoscience and Nanotechnology Letters**, 2015, 7(6): 486-494.
- [26] 郝方, 裴秀英, 张雪莲, 等. 结核分枝杆菌异柠檬酸裂解酶基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(12): 845-848.
- HAO F, PEI X Y, ZHANG X L, et al. Molecular cloning, expression, purification and properties of isocitrate lyase gene from *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv[J]. **Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, 2005, 28(12): 845-848. (in Chinese)
- [27] PINZAUTI G, GIACHETTI E, VANNI P. Isocitrate lyase of conifers (*Pinus pinea*) [J]. **The International Journal of Biochemistry**, 1982, 14(4): 267-275.
- [28] TIWARI A, KUMAR A, SRIVASTAVA G, et al. Screening of anti-mycobacterial phytochemical compounds for potential inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase[J]. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2019, 19(8): 600-608.
- [29] BHUSAL R P, PATEL K, KWAI B X C, et al. Development of NMR and thermal shift assays for the evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase inhibitors[J]. **MedChemComm**, 2017, 8(11): 2155-2163.
- [30] NGUYEN H H, KIM M. An overview of techniques in enzyme immobilization[J]. **Applied Science and Convergence Technology**, 2017, 26: 157-163.
- [31] XIA C, LU J P, XU B T, et al. Design and characterization of a labeling reagent for covalent immobilization of glutathione-S-transferase[J]. **Nanoscience and Nanotechnology Letters**, 2019, 11(11): 1547-1560.