DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.017
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0965-04

论著

一种新 Pre-$S_{(2)}$ 合成肽 CTL 表位糖基化方法

周吉军,王祥智,吴玉章,邹丽云,周 伟 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 为研究 HBV Pre-$S_{(2)}$ 上糖基化(Glycosylation)结构差异(包括位置、种类、数量和糖链长度差异)与其生物学活性关系,建立一种N-或O-连接糖基化以外的合成肽α-和ε-氨基糖基化方法。方法 用化学方法将单、双和聚糖共价连接在 Pre-$S_{(2)}$ 合成肽上的含α-和ε-氨基的氨基酸残基上,即具体连接在肽N端M1的α-氨基和K16的ε-氨基上。此二氨基酸残基位于或接近 Pre-$S_{(2)}$ 上公认的一个 CTL 表位,氨基酸残基1~15。结果 Pre-$S_{(2)}$ 合成肽聚糖(Mannan)、单糖(GalNAc)和双糖(Glc-Gal)糖基化的收益率分别为24.0%、24.5%和21.0%。经还原处理后,稳定性显著增加。HPLC 图谱显示一包容峰。结论 结果显示此方法具较高的糖基化效率,为研究 Pre-S_2 糖肽免疫学活性提供了一种新手段。但存在糖基化的均一性欠佳,费时较长的缺点。

关键词:糖基化;多肽合成;Pre-$S_{(2)}$;高压液相色谱(HPLC)
中图法分类号:R392.1;R394—33 文献标识码:A

A new method for glycosylation of synthetic Pre-$S_{(2)}$ peptides

ZHOU Ji-jun, WANG Xiang-zhi, WU Yu-zhang, ZOU Li-yun, ZHOU Wei (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design a new method of glycosylation for studying the relationship between the structural heterogeneity of carbohydrates and biological activity of glycoproteins. Methods The Pre-$S_{(2)}$ peptides were glycosylated by the covalent binding of carbonyl in open-chain form of monosaccharides (or disaccharides, polysaccharides) to α-(M1) or ε-amino groups (K16) by chemical method, and the residues were situated in or near to the CTL epitope(1~15) of Pre-$S_{(2)}$. Results The yield (%) of mannan, Gal NAc and Glc-Gal glycosylated synthetic Pre-$S_{(2)}$ in different reaction time were 24.0%, 24.5% and 21.0%. After reducation of C=N to C—N by pyridine-borane complexes the stability of glycosylation could be reinforced. Conclusion This method possesses a high efficiency of glycosylation, but with some shortcomings such as time-consuming and the homogeneity of glycosylation is not good enough.

Key words: glycosylation; peptide synthsis; Pre-$S_{(2)}$; HPLC

有关蛋白翻译后修饰(Posttranslational modification)特别是糖基化研究越来越引起人们重视,糖基化对蛋白(肽)生物学活性产生重要影响。已证实乙型肝炎病毒(HBV)3种表面蛋白S,M和L,均为糖基化蛋白[1]。而蛋白上所含糖的种类、大小及其在HBV生活史中所起的具体生物学作用还不太清楚。研究HBV表面蛋白上糖基化结构差异(包括位置、种类、数量和糖链长度差异)与其生物学活性关系,对研究HBV病毒生物学、研制抗病毒药物,及新型疫苗的分子设计都具重要意义。目前,大多数有关HBV表面蛋白糖基化的研究都集中在N-[即糖连接在天冬酰胺(Asn)残基上]或O-[即糖连接在羟基氨基酸(如Ser、Thr等)残基上]连接糖基化上,而糖基化还可能以S-及α-和ε-氨基糖基化形式存在[2]。

Pre-$S_{(2)}$ 蛋白含多个B、T细胞表位,是研究HBV表面糖蛋白免疫学活性较理想的片断之一。目前对糖蛋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:周吉军(1967—),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事表位糖基化与HBV特异性CTV应答方面的研究,发表论文6篇,现在附属西南医院全军感染病研究所。电话:(023)68754479
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

白生物学活性的研究主要采用糖肽合成方法，常用的是先制备糖肽合成构建单位，即先将目标糖连接到固相合成原料—N-保护氨基酸（如 Asn、Ser、Thr 等）上，变成糖基化氨基酸，然后用固相合成方法合成糖肽，该方法主要由于用于肽 N-糖基化和 O-糖基化研究。本研究介绍一种除 N-糖基化和 O-糖基化以外的一种肽直接糖基化方法，即使目标糖开环结构上的醛基或羰基与 Pre-$S_{(2)}$肽上位于或靠近 CTL 表位 1～15 的 M1 之 α-氨基和 K16 之 ε-氨基共价结合，形成类似 Schiff 碱结构，然后用还原剂吡啶-硼烷复合物（Pyridine-borane complexes）把不稳定的 C＝N 双键还原为较为稳定的 C-N 单键，这为研究 Pre-$S_{(2)}$糖肽免疫学活性提供了一种新手段。

1 材料与方法

1.1 合成 Pre-$S_{(2)}$肽

选取 adw 亚型乙肝病毒 Pre-$S_{(2)}$多肽序列：

10 20 30 40 50

MQWNSTAFHQ ALQDPKVRGL YFPAGGSSSG TVNPAPNIAS HISSISARTG DPVTNP

采用固相合成法，利用 Fmoc 标准方案，在固相多肽合成仪（ABI 431A 型）上进行，合成 Pre-$S_{(2)}$多肽。

1.2 Pre-$S_{(2)}$多肽糖基化

1.2.1 选取有代表性的单、双和多糖各 1 种。单糖选 N-乙酰氨基半乳糖（GalNAc），双糖选 α-D-吡喃葡萄糖-β-D-吡喃半乳糖（α-D-glucopyranosyl-β-D-galactopyranose，Glc-Gal），多糖选甘露聚糖（Mannan）。

1.2.2 取无菌 10 ml 试管 12 支，分为 3 组，每组 4 支。各组分别加入 GalNAc、Glc-Gal 和甘露聚糖，然后均加入 Hepes（pH 7.2）、叠氮钠（Sodium azide）、苯甲基磺酰氟（Phenylmethylsulfonylfluoride）及所合成的 Pre-$S_{(2)}$多肽，使各试管中混合物总量为 3 ml，且各组分浓度分别为 GalNAc（0.4 mol/L）、Glc-Gal（0.2 mol/L）、甘露聚糖（0.1 mol/L）、Hepes（2 mmol/L）、叠氮钠（3 mmol/L）、苯甲基磺酰氟（2 mmol/L）、Pre-$S_{(2)}$合成肽（10 mg/ml）。各组4 支分别于 37 ℃温育 5、9、15、19 d。

1.2.3 各组反应结束前，分别取出 1 ml 作稳定性比较之用；然后分别在剩余液中加入 1 ml 0.1 mol/L 吡啶-硼烷复合物的 10％甲醇/水溶液，室温 1.5 h。

1.2.4 各样本分别用 HPLC 纯化，使用 Waters 600 HPLC 仪，使用 C_{18}柱（C_{18} column，20× 250 mm），流动相为 0.1％TFA（三氟乙酸）水溶液/0.1％TFA 的 CH_3CN 溶液（55∶45）。

收集液真空抽干，称重，－20 ℃保存。

1.3 Pre-$S_{(2)}$多肽糖基化的检测

由于肽的糖基化产物在碱性条件下与四氮唑蓝（Nitroblue tetrazolium，NBT）结合成蓝色复合物，以 1-脱氧吗啉-D-果糖（1-deoxy-1-morpholino-D-fructose，DMF）作标准对照，分光光度计检测 530 nm 吸收度。

取 1 ml 含 0.25 mmol/L NBT 的 Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 缓冲液（0.1 mol/L，pH 10.8）加入 5 ml 试管中。加入 1 mg 糖基化 Pre-$S_{(2)}$多肽，标准对照加 0.01 mg DMF，空白对照加 1 mg Pre-$S_{(2)}$多肽。振荡混匀，37 ℃水浴 30 min。分光光度计 530 nm 比色，测吸光度。

1.4 使用吡啶-硼烷复合物还原与未还原糖基化 Pre-$S_{(2)}$合成肽糖基稳定性比较

选取反应时间为 15 d 的二类肽储存于－20 ℃冰箱，分别于第 7、14、21、28 天，每种肽各取 1 mg，分光光度计 530 nm 比色，测吸光度。

2 结果

2.1 固相肽合成法

合成 Pre-$S_{(2)}$肽 632 mg。不同反应时间糖基化 Pre-$S_{(2)}$合成肽的收益率，见表 1。

表1 不同反应时间糖基化 Pre-$S_{(2)}$合成肽收益率（％）

Tab 1 Yield of glycosylated synthetic Pre-$S_{(2)}$ in different reaction time（％）

Reaction time (d)	GalNAc	Glc-Gal	Mannan
5	13	15	11
9	18	20	17
15	23	24	20
19	24	24.5	21

2.2 HPLC 色谱图

图 1 为 Pre-$S_{(2)}$合成肽与 GalNAc 反应 15 d 的色谱图，保留时间为 3.993 min 的峰为糖基化肽，保留时间为 2.853min 的峰为未糖基化肽，此时流动相流速为 2 ml/min。图 2 为所收集的 GalNAc 糖基化 Pre-$S_{(2)}$合成肽的色谱图，其余色谱图基本类似，故略。

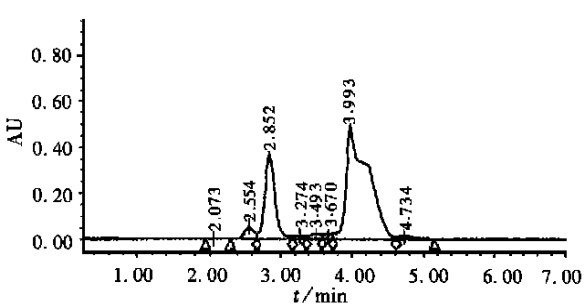


图1 Pre-$S_{(2)}$合成肽与 GalNAc 反应 15 d 的反应产物制备 RP-HPLC 色谱图

Fig 1 The RP-HPLC chromatogram of GalNAc glycosylation reaction to Pre-$S_{(2)}$（15 d）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

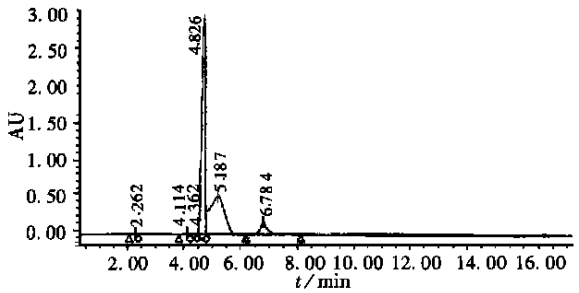


图 2　经制备 RP-HPLC 纯化后, 分离的 GalNAc 糖基化 Pre-S(2)色谱图, 此时流动相流速为 1 ml/ min

Fig 2　The RP-HPLC chromatogram of purified GalNAc glycosylated Pre-S(2)(15 d)

2.3　HPLC 纯化后, 比色法测定不同反应时间各种糖基化 Pre-S(2)合成肽的吸光度

结果见图 3。反映不同时间的糖基化效率, 表明 15 d 后, 反应趋于平衡。

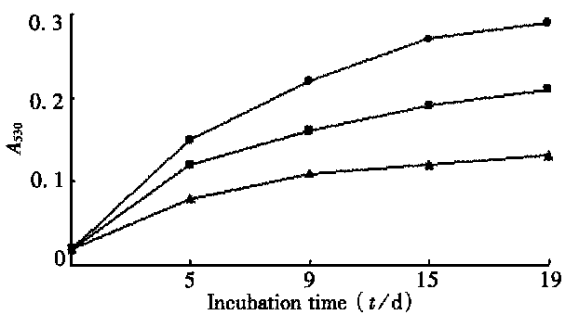


图 3　各种糖基化肽不同反应时间的比色吸光度

Fig 3　Glycosylation of synthetic Pre-S(2) peptides with 0.4 mol/ L Gal NAc (▲), 0.2 mol/ L Glc-Gal(■), and 0.1 mol/ L mannan(●)

2.4　吡啶-硼烷复合物还原与未还原糖基化 Pre-S(2)合成肽糖基稳定性比较

图 4 显示经还原后, 糖基稳定性较高。图 5 显示未经还原糖肽的糖基稳定性较差。

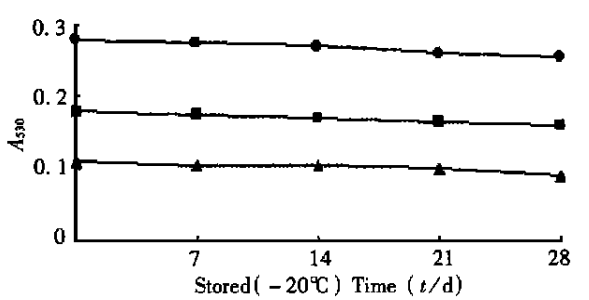


图 4　经还原糖肽保存不同时间后的吸光度

Fig 4　The absorbance of reduced glycosylated Pre-S(2) peptides with GalNAc(▲), Glc-Gal(■), and mannan(●)

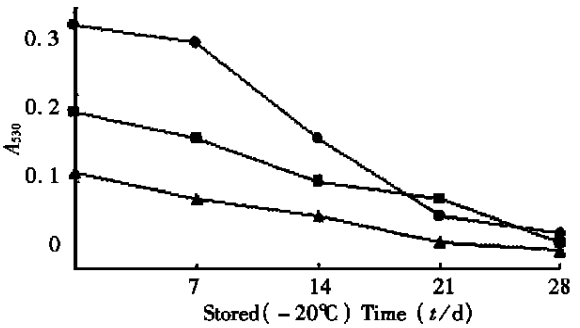


图 5　未经还原糖肽保存不同时间后的吸光度

Fig 5　The absorbance of unreduced glycosylated Pre-S(2) peptides with GalNAc(▲), Glc-Gal(■), and mannan(●)

3　讨论

病毒糖蛋白是由宿主细胞合成, 因此不易与宿主糖蛋白区别, 如 HIV、HBV、流感病毒以及部分原生寄生生物等, 这可能是它们具有免疫逃避、抵抗补体等特性的重要原因。

乙型肝炎病毒(HBV)所含 3 种表面糖蛋白 S, M 和 L, 在内质网中被翻译后修饰后, 被糖基化。有关 HBV 糖基化研究的热点主要集中在 N-、O-糖基化上, 目前公认 HBV 表面蛋白的 N-糖基化是 HBV 颗粒装配和分泌所必需的[3], N-连接糖(单糖, 寡糖或聚糖)可以通过所含化学键与氨基酸残基间及各表面蛋白间发生交互作用, 辅助蛋白适当折叠, 如形成 β-转角、回型结构(Loop structures), 促进病毒蛋白转运和装配, 并形成病毒(蛋白)分泌所需的跨膜拓扑学(Transmembrane topology)结构, 而 O-糖基化与 HBV 装配和分泌无直接关系。已证实 3 种蛋白 S 区均含一个 N-糖基化位点, M 蛋白在其 Pre-S(2)区氨基末端额外有一 N-糖基化位点(Asn4), 并含 N-连接寡糖[3]。HBV 表面, 特别是 Pre-S(2)区 C 末端的 27~47 上富含 Ser 或 Thr, 这提供了丰富的 O-糖基化位点。Schmitt 等[4] 通过胰酶消化病人来源的 HBV 亚病毒颗粒, 获得 Pre-S(2)(糖)肽, 纯化后, 利用离子交换色谱, 甲基化分析(Mathylation analysis)以及靶序列外切糖苷酶消化组合基体辅助激光解吸/电离时间飞行质谱(MALDI-TOF-MS)技术, 发现 M 蛋白(而不是 L 蛋白)的 Pre-S(2)区存在 α-GalNAc。此外, 糖基化还可能以 S-及 α-和 ε-氨基糖基化形式存在。Pre-S(2)蛋白含多个 B、T 细胞表位, 是研究 HBV 表面糖蛋白免疫学活性较理想的片断之一, 弄清其糖基化生物学意义, 对研究 HBV 病毒生物学、研制抗病毒药物, 及新型疫苗的分子设计都具重要意义。

目前对糖蛋白生物学活性的研究主要采用糖肽合

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

成方法,常用的是先制备糖肽合成构建单位,即先将目标糖连接到固相合成原料—N-保护氨基酸(如 Asn、Ser、Thr 等)上,变成糖基化氨基酸,然后用固相合成方法合成糖肽。该方法主要由于用于肽 N-糖基化和 O-糖基化研究。由于糖基化还可能以 S-及 α-和 ε-氨基糖基化形式存在,本研究就是一种除 N-糖基化和 O-糖基化以外的一种糖基化方法,即使目标糖开环结构上的醛基或羰基与 Pre-S(2)肽上的 α-和 ε-氨基共价结合,并用还原剂把不稳定的 C=N 键还原为较为稳定的 C-N 键,提高了糖肽在溶剂或空气中稳定性,这为研究 Pre-S(2)糖肽免疫学活性提供了一种新手段。本实验用吡啶-硼烷复合物还原的糖基化 Pre-S(2)合成肽的糖基较稳定,而未还原的糖基化 Pre-S(2)合成肽糖基稳定性差。

此方法是用化学方法将糖共价连接在 Pre-S(2)合成肽上的含 α-和 ε-氨基的氨基酸残基上,即具体连接在肽 N 端 M1 的 α-氨基和 K16 的 ε-氨基上,此二氨基酸残基位于或接近 Pre-S(2)上公认的一个 CTL 表位,氨基酸残基 1~15。用此方法可研究该表位糖基化对其免疫学活性的影响,特别是对诱导特异性 CTL 的影响(研究结果另文报告)。

糖基化的 Pre-S(2)合成肽用反相 HPLC 方法纯化,从 HPLC 色谱图中,可见由于糖基化后极性改变,糖基化 Pre-S(2)合成肽与未糖基化 Pre-S(2)合成肽在反相 HPLC 上可明显区分开来,保留时间为 2.853 min 的峰为未接上糖的 Pre-S(2)合成肽,而保留时间为 3.993 min 的峰为糖基化 Pre-S(2)合成肽,糖基化后极性改变,使保留时间延长,且明显看出该峰为一包容峰,其中可能包含 3 种糖基化肽,即 α-和 ε-氨基均被糖基化和仅 α-或 ε-氨基二者之一被糖基化 Pre-S(2)合成肽。

分离得到的糖基化肽后,利用糖基化产物在碱性条件下与 NBT 结合成蓝色复合物这一特性,以 DMF 作标准对照,分光光度计检测 530 nm 吸收度,结果表明 15 d 以后,糖基化反应基本呈平衡状态。

从比色检测结果和收益率结果来看,显示此方法具较稳定,可以达到肽直接糖基化目的。但此方法也有一些局限性,最主要的是糖基化的均一性欠佳,这一点可从 HPLC 色谱图中,每个糖基化反应均生成包含 3 种糖基化肽的包容峰表现出来。另外还有费时较长的缺点。

参考文献:

[1] Wounderlich G, Bruss V. Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers[J]. Arch Virol, 1996, 141(7): 1 191—1 205.

[2] Ivo S. Glycation of albumin: Rection with glucose, fructose, galactose, ribose or glyceraldehyde measured using four methods [J]. J Biochem Biophy Methods, 1994, 28(2): 115—121.

[3] Lu X, Mehta A, Dwek R, *et al*. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion[J]. Virology, 1995, 213(2): 660—665.

[4] Schmitt S, Glebd D, Alving K, *et al*. Analysis of the Pre-S(2) N- and O-linked Glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11 945—11 957.

(编辑 汪勤俭)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2000)09-0968-01

小儿外伤性脑梗塞 26 例报告

Report of 26 cases of pediatric traumatic brain infarction

王德明 (四川省广安市人民医院脑外科,广安 638000)

小儿外伤性脑梗塞在临床较为少见。我院从 1995~1999 年收治小儿外伤性脑梗塞 26 例,经非手术治疗,疗效满意,现就其治疗结果,结合文献报告如下。

作者简介:王德明(1958—),男,四川省广安市人,主治医师,发表论文 5 篇。电话:(0826)2224476

收稿日期:2000-06-10;修回日期:2000-09-08

1 临床资料

26 例患儿,男 17 例,女 9 例。年龄 11 个月至 13 岁,平均 5.6 岁。致伤原因:车祸伤 15 例,坠跌伤 9 例,打击伤 2 例,均为闭合性颅脑损伤。

(下转 971 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net