维普资讯 http://www.cqvip.com

1995 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1995

(5)
174-176
R378.996
R938.17

肺炎克雷伯氏菌 DNA 旋转酶分离及喹诺酮类药物对其抑制作用

第一医院传染科　肖永红　王其南
日本第一制药株式会社研究开发中心　北村昭浩　佐藤谦一

提　要　应用溶菌酶溶菌、硫酸铵沉淀蛋白质及新生霉素琼脂糖 CL—6B 亲合层析相结合的方法，成功地从肺炎克雷伯氏菌 900129 分离到 DNA 旋转酶的 A、B 亚单位，单独的 A、B 亚单位均无 DNA 旋转酶活性，以 A、B 亚单位重建的酶能将松弛的质粒（pBR322）DNA 转变为超旋型。各种喹诺酮类药物对其活性具有抑制作用。萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、斯巴沙星、环丙沙星对该酶活性 50% 抑制浓度（$1C_{50}$）分别为 10.46、1.35、0.35、0.42 和 0.12μg/ml。各药物 $1C_{50}$ 与其最低抑菌浓度（M1C）相平行。

关键词　肺炎克雷伯氏菌；DNA 旋转酶；喹诺酮类；$1C_{50}$
中图分类号　R378.996

DNA 旋转酶为喹诺酮类抗菌药物作用的靶位。该酶由 A_2、B_2 四个亚基组成，对细菌 DNA 的复制、转录等具有十分重要的意义[1]。该酶的分离纯化对研究喹诺酮类的作用机制及细菌的耐药性有重要价值。本文从肺炎克雷伯氏菌分离旋转酶，并测定了喹诺酮类对其活性的抑制作用。

1　材料与方法

1.1　药物　萘啶酸（NA）、诺氟沙星（NFLX）、氧氟沙星（OFLX）、环丙沙星（CPFX）以及斯巴沙星（SPFX）均由第一制药株式会社合成提供。

1.2　细菌与培养基　肺炎克雷伯氏菌 900129 为临床分离之喹诺酮敏感菌。培养基 B 用于收集细菌，其成份为每升蒸馏水含 10g 多肽，2g 酵母提取物干粉，8g 磷酸氢二钠（$12H_2O$），2g 磷酸二氢钾，1.2g 硫酸铵，12g 葡萄糖及 0.24g 硫酸镁。MH 肉汤和琼脂用于测定药物最低抑菌浓度。

1.3　药物最低抑菌浓度测定　以标准琼脂平板稀释法测定药物最低抑菌浓度（M1C）。MH 肉汤过夜培养之肺炎克雷伯氏菌 900129，稀释为 0.5McFarland 单位（约 10^8CFU/ml），用多点接种仪接种（1－2）μl 细菌到含不同浓度药物的 MH 琼脂平板，每点约 10^5CFU。37℃孵育 18 小时后判定结果，以能完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 M1C。

1.4　DNA 旋转酶的分离　肺炎克雷伯氏菌 900129 经前培养增菌后。转入培养基 B 中大量培养（37℃，振荡 4－5 小时），4℃离心（7000rpm、20min）集菌，以适当 TED 缓冲液（10mM Tris·HCL〔pH7.4〕，1mM EDTA，1mM 二硫苏糖醇）混悬集中，再次离心后，保存湿菌于－80℃冰箱中备用。

湿菌约 20g，以 80mlTED 缓冲液混悬，加入 200mM 二硫苏糖醇 1.4ml，500mM EDTA 5.5ml，1M KCl13.8ml，20mg/ml 溶菌酶 5.5ml，4℃轻轻搅拌 15min 后加入 10% Brij－58 5 5ml，继续搅拌 2 小时，再 37,000rpm，离心 1 小时收集上清液，加入链霉素达终浓度 2%，搅拌 30min 沉淀核酸，离心 10,000rpm，15min 收集上清液，加入硫酸铵达终浓度 20%。沉淀杂蛋白，再次离心后，上清液再以 40% 终浓度硫酸铵沉淀，离心（10,000rpm、15min）收集沉淀，以适当缓冲液溶解后，再 TED 缓

维普资讯 http://www.cqvip.com

冲液透析3次、每次2小时以上。透析液上于预先用TED缓冲液平衡的新生霉素琼脂糖CL－6B层析柱，TED缓冲液平衡后，在UV－280监测下用含0.1M、2M KCl、5M尿素的TED缓冲液分步洗脱。洗脱组分立即用TED缓冲液透析3次。再以50%甘油TED缓冲液浓缩，保存于－80℃冰箱。以上方法参考Sato等[2]报道。从溶菌起各步均在4℃以下进行。

1.5 酶活性测定 在琼脂糖凝胶电泳上，以松弛型质粒DNA转化为超旋型来测定DNA旋转酶活性。反应物(20ul)含40mM Tris·HCl(PH7.4)，40mM KCl，8mM $MgCl_2$，2mM ATP，2mM DTT，2mM亚精胺，40μg tRNA，0.2μg松弛型pBR322 DNA，40μgBSA．加入DNA旋转酶后，37℃孵育1.5小时，0.8%琼脂糖凝胶电泳，溴吖啶染色，紫外线下摄像。以超旋型DNA带色度判断酶活性强弱。

1.6 药物对DNA旋转酶的抑制作用 DNA旋转酶以最适亚单位比例重建，使其活性最强。按上述分析酶活性条件，但反应物中加入不同浓度药物，经孵育、电泳、染色后，以负片摄像，用密度扫描仪测量松弛与超旋DNA带密度，与无药对照比较，以抑制50%松弛DNA转化为超旋型的药物浓度($1C_{50}$)表示其对酶活性的抑制作用。

2 结果

2.1 DNA旋转酶分离及活性测定 经上述方法，肺炎克雷伯氏菌900129之DNA旋转酶A、B亚单位分别被含2M KCl和5M尿素的TED缓冲液从新生霉素琼脂糖CL－6B亲合层析柱上洗出(图1)。单独A、B亚单位均无酶活性，两者按适当比例重建后所得全酶，能将松弛型质粒DNA转变为超旋型。A、B亚单位活性最强组分为图中流出峰之上升部份。

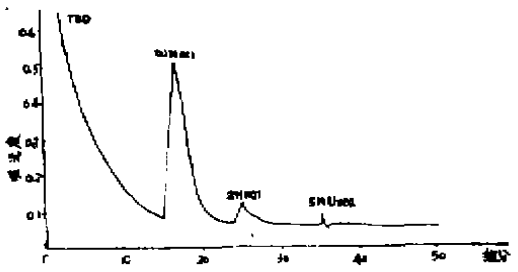


图 肺炎克雷伯氏菌900129DNA旋转酶粗提取物新生霉素琼脂糖CL－6B亲合层析流出图

2.2 喹诺酮类对DNA旋转酶的抑制 A、B亚单位以不同比例重建，选出两者的4∶5比例，重建所得最强活性全酶用于该分析。所得NA、NFLX、OFLX、SPFX及CPFX的$1C_{50}$分别为10.46、1.35、0.35、0.42、0.12μg/ml(表1)。表1同时列出了各种药物对肺炎克雷伯氏菌900129的M1C值。可见M1C值与$1C_{50}$值呈平行关系，即抑酶作用愈强，则药物M1C值也愈低。

表 各药物$1C_{50}$与M1C值

药物	浓度(μg/ml)	
	$1C_{50}$	M1C
NA	10.46	6.25
NFLX	1.35	0.78
OFLX	0.35	0.20
SPFX	0.42	0.20
CPFX	0.12	0.025

3 讨论

DNA旋转酶为喹诺酮类药物的作用靶位，分离纯化该酶对研究药物抗菌机理及细菌耐药性具有十分重要作用。DNA旋转酶在细菌中含量甚微，稳定性极差，分离十分困难。该酶由A_2B_2四个亚基组成，其B亚单位能与新生霉素特异结合。故此，先经溶菌，去除核酸及杂蛋白质得粗提取物，再以新生霉素琼脂糖CL－6B进行亲合层析，成功地分离到具有较强活性的DNA旋转酶A、B亚单位，用亚单位重建所得全酶，能将松弛型质粒DNA转化为超旋型，当两者以4∶5比例混合时，酶活性最强，表明菌体内A亚单位较B亚单位多。

喹诺酮类药物为全合成抗菌剂，以抑制DNA旋转酶而发挥其抗菌作用。本文所得$1C_{50}$与M1C值呈现平行关系，也说明这一结

维普资讯 http://www.cqvip.com

176-179　R554.603　R554.602

原发性血小板减少性紫癜患者体液免疫指标与血小板功能测定的分析

临床血液学教研究室　刘国卿

重医一院内科　梁晓玫　黄宗干

提　要　本文检测了 28 例 ITP 组患者的体液免疫指标，以及血小板粘附功能、聚集功能，并与正常组、对照组作了比较。观察了 ITP 患者的各类体液免疫指标的变化以及这些指标之间的相互关系。分析了 ITP 组患者各类体液免疫指标与血小板数量，以及与血小板粘附、聚集功能之间的关系。揭示 ITP 患者 PAIgG 增高不但与血小板数量减少有关，而且与患者的血小板的粘附功能降低有关。

关键词　血小板；紫癜；体液免疫；粘附功能；聚集功能　血小板减少性，免疫学

中图分类号　R558.2

原发性血小板减少性紫癜(ITP)患者体液免疫指标的检测以及这些体液免指标与血小板计数的关系国内外研究报道较多[1]。而对这类患者的体液免疫学指标的变化与血小板功能变化的分析研究国内报道甚少。本文主要观察了 ITP 患者血小板相关 IgG (PAgG)、IgG、C_3、CIC、F_n(Fibronectin)与血小板数量以及与血小板粘附功能、聚集功

论。

本试验中，细菌用量大，加之酶含量低和不稳定，操作中溶菌与层析是关键步骤，且所有过程均须低温条件下进行。

参 考 文 献

1. Gellert M · Ann Rev Biochem 1981;50:819

2. Sato K, et al. Antimicrob Agent Chemother 1986;30:777

(收稿日期 1994－10－12)

PURIFICATION OF DNA GYRASE RFOM KLIBSIELLA PNEUMONIAE AND INHIBITORY EFFECT OF QUINOLONE ON ITS SUPERCOILING ACTIVITY

Xiao yonghong , et al

Dept .of Infectious diseases.

The First Hospital

Subunit A and B proteins of DNA gyrase from Klibsiella pneumoniae 900129 were successfully and seperately purified by the combined method of bacterial lysis using lysozyme, protein precipitation with ammonium sulfate and affinity chromatography on novobiocin Sephero－se CL－6B. Both uncoupled subunit A and B had no enzymatic activities. But the reconstituted holoenzyme with subunit A and B counld converse the relaxed plasmid pBR322 into supercoiling form. Quinolone could inhibit the supercoiling activity of DNA gyrase. The 50% inhibitory concentration (IC50) of nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and ciprofloxacin were 16.46、1.35、0.35、0.42、0.12μg/ml respectively. The IC50 of quinolone were correlated with their MICs.

KDY WORDS Klibsiella pneumoniae; DNA gyrase; Quinolone; IC50