DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.007
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0393-03

论著

肽抗生素hPAB-β的化学合成及其杀菌活性的初步证实

饶贤才,金晓琳,胡晓梅,朱军民,陈自瑾,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室、重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 化学合成、纯化并初步测定肽抗生素hPAB-β的活性,为后续研究奠定基础。方法 采用固相合成法合成肽抗生素hPAB-β,经RP-HPLC纯化,用质谱进行分子量鉴定,谷胱甘肽氧化/还原法复性合成产物,进一步用阳离子交换柱纯化复性产物,收集主峰,药敏法初步测定合成肽的抗菌活性。结果 合成肽抗生素hPAB-β的纯度为86.52%,经质谱分析,合成肽的分子量测定值与理论值相符。用谷胱甘肽氧化/还原法复性合成肽取得了较好的效果。复性产物对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌具有杀灭作用。结论 化学合成的肽抗生素hPAB-β具有良好的杀菌活性。

关键词:肽抗生素;化学合成;蛋白纯化;杀菌活性
中图法分类号:R914.5;R978.1 文献标识码:A

Synthesis and bactericidal activities of peptide antibiotics hPAB-β

RAO Xian-cai, JIN Xiao-ling, HU Xiao-mei, ZHU Jun-ming, CHEN Zi-jin, HU Fu-quan (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To synthesize, purify and explore bactericidal activities of peptide antibiotics hPAB-β. Methods Peptides were synthesized with solid phase strategies. After cleavage of peptides from resin, the released peptides were purified with reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and characterized with mass spectrometry. Renaturation of synthetic peptides was carried out in glutathione oxidized/reduced system. The renatured hPAB-β was purified again with cationic exchange chromatography. The bactericidal activities of purified hPAB-β to *E. coli*, *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus* were performed with plate method. Results The final purity was at least 86.52% identified by RP-HPLC. The obtained molecular mass was identical to its theoretical value. The tested microorganisms included *E. coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus* were sensitive to the synthetic peptides. Conclusion The synthetic hPAB-β has good bactericidal activities.

Key words: peptide antibiotics; synthesis; purification; bactericidal activities.

传统的抗生素多由霉菌或放线菌产生,故称为青霉素、链霉素、庆大霉素等。抗生素的发现和进入临床应用,拯救了千千万万受病菌感染病人的生命。但耐药菌问题的不断出现,已给目前的临床治疗带来了严重挑战[1]。

近年来,从多种动物、昆虫体内分离到200多种具有广谱抗微生物活性的小分子肽类物质,部分小肽分子还具有抗真菌、抗寄生虫、抗病毒、抗肿瘤等生物学功能,现称这种小肽分子为肽抗生素(Peptide antibiotics)[2~4]。肽抗生素的发现为人类寻找新型抗生素提供了崭新的途径。我们在前期工作中通过对已报道动物肽抗生素序列的分析,设计了一对通用引物,从人皮肤角朊上皮细胞中克隆到一肽抗生素基因hPAB-β(Human beta peptide antibiotics),确定了该肽抗生素的氨基酸一级序列。本研究通过化学合成hPAB-β的成熟肽,经复性及杀菌活性测定,初步证实所克隆的肽抗生素具有杀菌活性。

1 材料与方法

1.1 肽抗生素hPAB-β

我们克隆到的肽抗生素hPAB-β为41肽,理论分子量4333.25,等电点pI为9.001。

1.2 成熟肽的化学合成

目的肽的化学合成委托我校免疫学研究所按我们提供的序列采用固相化学合成法合成。多肽合成在ABI 431A型多肽合成仪(美国PE公司)上进行。方法采用标准Fmoc方案,略加修改,精氨酸采用两次偶联。起始选用0.25 mmol HMP树脂(PE公司),按照多肽序列使肽链从羧基端逐个向氨基端延伸,氨基酸:树脂=4:1。各种氨基酸的保护基团分别是:各氨基酸的α-氨基为Fmoc基团保护;其余侧链保护基团为Lys(Boc)、Ser(tBu)、Glu(OtBu)、Arg(Pmc)、His(Trt)、Cys(Trt)、Thr(tBu)和Tyr(tBu)。第一个氨基酸连接到树脂上用DMAP,氨基酸的活化用HOBt和DCC,偶联后用20%哌啶溶液去除Fmoc保护集团。多肽合成后,将合成物在冰浴条件下混合于10 ml切割液中(含结晶苯酚0.75 g,EDT 0.25 ml,苯甲硫醚0.5 ml,去离子水0.25 ml,TFA 10 ml),待切割液温度上升到室温,继续搅拌反应1.5 h,使肽链从树脂上切割下来,同时去除多种保护基团。将反应后混合物经G4玻砂漏斗过滤以去除树脂,先后用约1 ml TFA、5~10 ml DCM冲洗反应瓶、树脂和漏斗。将滤液在常温低压下蒸发至1~2 ml,加入50 ml预冷乙醚沉淀多肽,然后真空抽干,即得肽抗生素粗制品。

1.3 RP-HPLC纯化、分子量测定

将合成肽抗生素用DMSO溶解,浓度为20 mg/ml,纯化在Delta 600型HPLC仪(美国Waters公司)上进行,纯化选用Source 30 RPC(Pharmacia公司)制备柱,流动相选用乙氰溶液(含0.1% TFA),流速为2.0 ml/min,紫外监测波长为214 nm,经10%~60%乙氰溶液梯度洗脱20 min,少量多次纯化,收集主峰,低温低压冻干备用。

纯化后合成肽的分子量测定在API 2000型质谱仪(美国Waters公司)上进行。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800037,30171119);全军"十五"科研基金重点资助项目(01Z070);重庆市攻关课题资助项目(2000)
作者简介:饶贤才(1967-),男,浙江省江山市人,博士研究生,副教授,主要从事抗微生物感染方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752239
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hufuquan@yahoo.com
收稿日期:2002-01-29;修回日期:2002-03-11

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

1.4 合成肽抗生素的复性

由于肽抗生素 hPAB-β 肽链中有 3 对二硫键，故必须通过复性恢复其天然结构，目的肽才可能具有活性。复性采用谷胱甘肽氧化/还原系统[5]。即在 pH 7.7 的 0.1 mol/L 醋酸铵缓冲系统(含有 0.5 mol/L 精氨酸)中加入合成肽抗生素/还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽，三者的比例是 1∶20∶2。将反应液在室温搅拌 24 h，复性即完成。

1.5 合成肽的抗菌活性初步测定

为知晓合成肽抗生素的活性，按文献[6]报道的平板法直接测定合成肽复性混合物对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的杀菌活性。

2 结果

2.1 RP-HPLC 分析结果

合成肽抗生素的 RP-HPLC 的分析结果见图 1。经积分运算，肽抗生素主峰面积占所有峰面积的百分数达 86.52%。

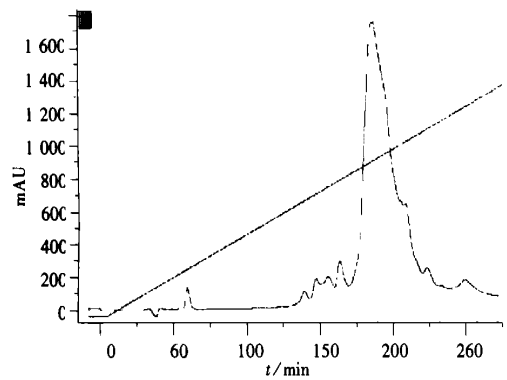


图 1 合成 hPAB-β 的 RP-HPLC 纯化分析

Fig 1 Purification of synthetic hPAB-β with RP-HPLC

2.2 质谱鉴定结果

肽抗生素 hPAB-β 的理论分子量为 4333.25，经质谱分析，见图 2，纯化后的合成肽抗生素的分子量测定值为 4338.96，测定值与理论值相符。

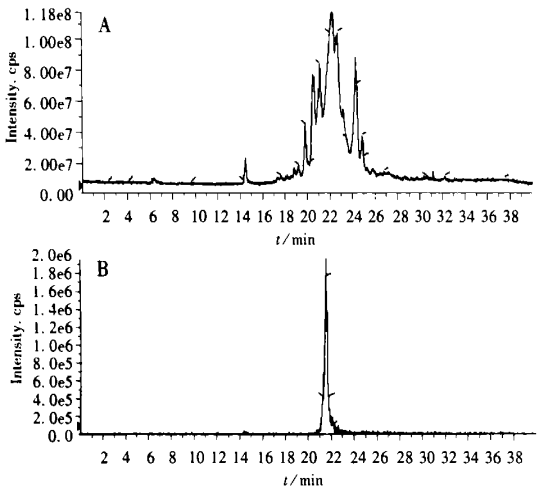


图 2 合成 hPAB-β 的质谱分析

Fig 2 Mass spectrometry analysis of synthetic hPAB-β

2.3 杀菌活性测定

平板法测得合成并复性的肽抗生素 hPAB-β 对铜绿假单胞菌 PaP6 株具有良好的抗菌活性，结果见图 3。同时，平板法测定表明肽抗生素 hPAB-β 对大肠埃希菌 DE3、JM109、HB101，铜绿假单胞菌 PA103、金黄色葡萄球菌均具有良好的杀菌活性。

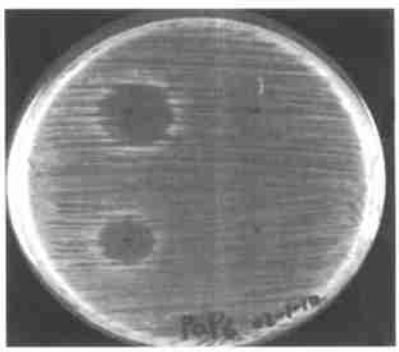


图 3 肽抗生素 hPAB-β 对铜绿假单胞菌 PaP6 株杀菌实验

Fig 3 Bactericidal activity of peptide antibiotics hPAB-β to pseudomonas aeruginosa PaP6 strain

3 讨论

在已知氨基酸序列的情况下，化学合成的方法是成熟的，但对于合成肽的后续处理，如纯化、复性、活性测定等则因研究对象不同需要进行个性化研究。我们克隆的肽抗生素 hPAB-β 亲水性好，选用 Pharmacia 的 Source 30 RPC 制备柱行 RP-HPLC 即可取得良好的分离效果，主峰面积占所有峰面积的 86.52%。收集主峰，经质谱分析，测得分子量为 4338.96，与 hPAB-β 理论分子量 4333.25 相符，表明合成后经 RP-HPLC 纯化的主峰为分子量正确的目的分子。对于一个活性分子来说，正确复性是获取活性分子的重要环节。一般认为，分子内二硫键的正确形成和抑制聚集体出现是提高蛋白质复性效率的主要因素[7]。对处于还原状态的变性蛋白质，二硫键的正确形成是复性的关键。体外复性时形成二硫键的方法有多种[5]，例如有稀释法、精氨酸法、甘氨酸氧化/还原法、谷胱甘肽氧化/还原法等。由于 hPAB-β 复性需要形成 3 对二硫键，我们选用了谷胱甘肽氧化/还原法，同时考虑到在复性过程中正在复性的蛋白质通过疏水基团的相互作用和分子间二硫键错配会聚集在一起，形成不溶解的蛋白质聚集体，故在谷胱甘肽氧化/还原系统中还加入 0.5 mol/L 精氨酸，以降低蛋白质聚集体的形成，提高复性效率。经过实验，发现在含有 0.5 mol/L 精氨酸 pH 7.7 的 0.1 mol/L 醋酸铵缓冲系统中加入合成肽抗生素/还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽，三者的比例是 1∶20∶2，将反应液在室温搅拌 24 h，取得了良好的复性效果。

复性后的混合物中除含合成肽外，还有大量的谷胱甘肽、精氨酸等，照理应进一步纯化以除去这些成分。我们也曾用 Sephadex G-50 柱作层析纯化，结果谷

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

胱甘肽与目的肽不能很好分离;用阳离子交换柱 Macro-Prep(r) High S(Bio-Rad 公司)纯化,则因大量谷胱甘肽的存在,目的分子也直接穿过柱子,未能有效纯化。故本研究直接用复性混合物作杀菌实验,通过平板法初步测得目标肽具有良好的杀菌活性,为后续研究奠定了很好的基础。目前我们已订购截留分子量为 1×10^3 的透析袋,准备先对复性混合物进行透析处理,再行阳离子交换纯化后,测定目的分子的浓度,进行抗菌谱和最小抑菌浓度的测定。

(致谢:感谢全军免疫学研究所吴玉章教授,贾正才博士,周伟老师,邹丽云老师在本研究有关肽分子的化学合成、RP-HPLC 纯化、质谱分析中给予的支持和帮助!)

参考文献:

[1] Muller S C, Decre D, Benoit C, *et al*. Levofloxacin: serum bactericidal activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 1999, 43(Suppl C): 67—70.

[2] Sahasrabudhe K S, Kimball J R, Morton T H, *et al*. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva[J]. J Dent Res, 2000, 79(9): 1 669—1 674.

[3] Selsted M E, Brown D M, Delange R J, *et al*. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages[J]. J Biol Chem, 1983, 258(6): 14 485—14 489.

[4] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview[J]. Biopolymers, 1999, 47(2): 413—433.

[5] Fischer B. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in E. coli as inclusion bodies[J]. Biotech Bioeng, 1993, 41(1): 1—3.

[6] Hwang S W, Lee J H, Park H B, *et al*. A simple method for the purification of antimicrobial peptide in recombinant escherichia coli[J]. Molecular Biotechnology, 2001, 18(1): 193—198.

[7] Bachner J. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: Single-chain immunotoxin from renaturation of bacterial inclusion bodies[J]. Anal Biochem, 1992, 205(1): 263—267.

(编辑 冷怀明)

文章编号:1000-5404(2002)04-0395-01

个案与短篇

冠心病介入治疗后伴一过性低血压反应的护理

The nursing care of temporary hypotension after the coronary interventional treatment

王叶丽,何多芬,李 静 (第三军医大学附属大坪医院野战研究所心血管内科,重庆 400042)

冠心病介入性治疗术作为有效的血运重建手段[1]在世界范围内广泛应用,而术后一过性低血压反应是一种危险的急症,严重时威胁病人生命。及时发现、处理此急症是冠心病介入术后的一个重要问题。本研究就此问题发生的原因及护理进行分析。

统计我科冠心病介入性治疗病人 33 例,男 20 例,女 13 例,年龄 58~76 岁,行经皮冠状动脉成形术(PTCA)者 9 例,PTCA 加冠脉内支架术(CS)24 例。发生一过性低血压病人 3 例,3 例均为 PTCA 及 CS 术后,占 9.09%,其中男 2 例,女 1 例,年龄 68~73 岁。3 例中有 1 例为返回病房后 75 min 出现低血压,2 例病人术后拔鞘管后 5 min 内出现恶心、冷汗,随即心率、血压下降,经积极抢救 3 例病人均在 60 min 内血压、心率恢复正常。严重的 1 例病人,在鞘管拔除后 2 min 内出现恶心、呕吐。随即心率由 78 次/min 降至 20 次/min,而后心跳停止约 5.4 s,意识丧失,血压为零,立即给予胸前区叩击,阿托品 0.5 mg 静注,654-2 10 mg 静注,4 min 后心率慢慢回升,血压上升,而后给予低分子右旋糖酐 250 ml 滴注,生理盐水 250 ml 加地塞米松 10 mg 快速滴注(40~50 guH/min),于 60 min 生命体征恢复正常。该 3 例病人发生低血压反应与病变程度无关。

讨论

冠心病介入性治疗术后引发的低血压,心率减慢状态是一种发生迅速,后果严重的并发症。其原因分析有以下几个方面[2]:①血容量不足,术前过度强调禁食禁水。②迷走神经反射性低血压,尤其是在拔管时更易发生。这是因手术时交感神经兴奋,一旦手术结束后,浑身放松,交感系统抑制,迷走神经相对兴奋或拔管时麻醉药作用时间已过,引起的疼痛所致。③出血,如急性或亚急性心包填塞,严重的内出血及血气胸等。其临床特点为血压明显下降的同时心率明显增快。④造影剂过敏。我科发生的 3 例病人,2 例为迷走神经反射性低血压,1 例为造影剂迟发性过敏反应,血容不足。凡是冠心病介入治疗病人护理要注意以下几个方面:①术前多向病人解释,解除其精神紧张;②术前可适当进食清淡、宜消化的饮食,不禁水食;③术后嘱病人多饮水,以利于造影剂的排泄;④在拔除鞘管前先给予充分的局麻:1%奴夫卡因从鞘管周围注入,隔 5~10 min 后再拔管,以减轻拔管时的疼痛;⑤术后返病房的 2 h 内以及拔除鞘管后要密切观察病情,及时发现低血压;⑥术后常规给予低分子右旋糖酐 250 ml,生理盐水 250 ml 加地塞米松 10 mg、654-2 20 mg 或阿托品 1 mg 静注;⑦做好急救药品和急救物品的准备。

关键词:冠心病介入治疗;低血压;护理
中图法分类号:R473.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] 沈卫峰. 实用介入心脏病学[M]. 上海:上海科技教育出版社,1997. 1—42.

[2] Topol E J. Catheter-baxed reperfusion for acute myocardial infarction textbook of interventional Cardiolgy[M]. New York: New York Press Limited Company. 3rd ed. 265—280.

(编辑 冯崇英)

作者简介:王叶丽(1964—),女,山西省汾阳人,主管护师,主要从事心脏病方面的研究,发表论文 16 篇。电话:(023)68757246

收稿日期:2001-01-12;修回日期:2001-11-15

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