

抗菌肽的固相合成、分离纯化与构效关系的研究

陆莹瑾 王 禾 屈贤铭 *

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 应用手工固相 DCC/HOBt 法合成 Cecropin B、Shiva 1、ABP 3、WHD 4 种抗菌肽。各抗菌肽的 C-端均为酰胺化。最终用 HPLC 分离纯化。这 4 种肽对大肠杆菌 K₁₂D₃₁、野生型大肠杆菌、产气杆菌及 4 种植物病原菌青枯菌、临床致病型大肠杆菌、伤寒杆菌、硝酸盐杆菌均有明显的杀伤或抑制作用,对白血癌细胞 K 560、肺癌细胞 A 549 也有杀伤作用。其中尤以 WHD 杀伤作用最为明显,并用对其它 3 种肽不能作用的枯草杆菌、绿脓杆菌也略有抑制。而 Shiva 1 对细菌的作用较其它 3 种肽弱,另外还用 CD 谱对 4 种抗菌肽的溶液构象做了初步研究。

关键词 抗菌肽,固相合成,抗菌活力

Hultmark 等^[1]注入活的大肠杆菌诱导。滞育的惜古比天蚕蛹(*Hyalophora cecropia*),从其血淋巴中分离出两种低分子量的碱性极强、具有很强抗菌活性的多肽。Steiner 等测定了它们的一级结构并给这类肽命名为 Cecropins^[2]。这类肽长度一般为 33~39 个氨基酸残基,分子量 4000 道尔顿左右,有较广的抗菌谱,对革兰氏阳性和阴性细菌都具有很高的抗菌活力。

Cecropin B 是目前已知天然抗菌肽中活力最强的一种。Shiva 1 是 Jaynes 等^[3]以 Cecropin B 为蓝本设计合成的。据他们报道,其抗菌活力强于 Cecropin B,并且可以杀伤疟原虫。ABP3 是王三山等^[4]根据 COR 预测结果设计的,希望在保全保守氨基酸的同时提高螺旋度以增强其杀菌能力。WHD 是我们从 Kaiser 和 Kezdy^[5]设计改造多肽的方法中得到启示而设计的,即在两亲螺旋的疏水面上替换所有氨基酸为亮氨酸残基。我们用手工固相合成的方法合成了 4 种抗菌肽,比较了它们对某些细菌的抗菌活力强弱。

材料与 方法

1.1 用 DCC/HOBt 法手工固相合成 4 种抗菌肽

1.1.1 试剂:原料氨基酸一般采用 N-端 t-Boc 保护,其中一些侧链上有活泼功能团的氨基酸均有侧链保护基。所有原料氨基酸,1-羟基苯并三唑(HOBt)和二异丙基乙基胺(DIEA)均来自 Sigma 公司。载体选用 ABI 公司生产的 mBHA 树脂(p-Methyl Benzhydrylamine Resin);三氟醋酸(TFA)来源于 Merck 公司。其它的试剂如:碳二亚胺(DCC)、二

* 通讯作者

国家 863 高技术基金项目。

本文于 1996 年 1 月 2 日收到。

氯甲烷(CH_2Cl_2)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)均为国产分析纯。

1.1.2 合成步骤:合成的基本方法是固相 DCC/HoBr 法^[6]。合成后的粗品经氟化氢切肽后冷冻干燥。

1.2 分离纯化 4 种合成的抗菌肽

1.2.1 Sephadex G-25 柱(14mm×100mm)脱盐:柱用 7% 醋酸平衡,上样后在流速为 1ml/min 下用同一平衡液洗脱,280nm 检测,收集第一个峰,冷冻干燥。

1.2.2 色氨酸(Trp)上甲酰基(Formyl)的脱除^[7]:将样品溶解于 0.03mol/L 的氯化羟胺($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)溶液(pH9.0)中,用稀氨水调节 pH,使之保持在 9.0。常温下搅拌 2~3h,定时用 Beckman Du-7500 分光光度计监测扫描,波长为 200~300nm。反应结束后,用 70% 醋酸将反应液 pH 调至 6.0,离心后取上清液上 Sephadex G-25 柱(23mm×500mm),条件与前相同,280nm 检测,收集第一个峰,冷冻干燥。

1.2.3 高压液相色谱(HPLC)的分离纯化: Cecropin B 分离采用分析型 C18 反相柱(Delta Pak, 15 μm , 3.9mm×300mm, Waters 公司),分析型高压液相色谱仪(Waters 490),以 25%~30% 的乙腈水溶液(水和乙腈中各含 0.05% TFA)线性梯度洗脱,流速 1ml/min,收集丰度最大峰。

ABP 3、Shiva 1 及 WHD 分离采用半制备型 C¹⁸ 反相柱(Ultrasphere ODS, 5 μm , 10mm×250mm, Beckman 公司),制备型高压液相色谱仪(Waters 990),以 20%~30% 的乙腈水溶液(水和乙腈中各含 0.05% TFA)线性梯度洗脱,流速 3ml/min,收集丰度最大峰。

1.3 抗菌肽的纯度鉴定

1.3.1 HPLC 鉴定:采用分析型 C¹⁸ 反相柱(Ultrasphere ODS 5 μm , 4.6mm×150mm, Beckman 公司),分析型高压液相色谱仪(Waters 490),以 20%~50% 的乙腈水溶液(水和乙腈中各含 0.05% TFA)线性梯度洗脱,流速 1ml/min。

1.3.2 小分子量尿素电泳:整个电泳过程按 BDH 说明书上的条件进行。与 Swank 和 Munkers^[8]的方法基本相同。

1.3.3 氨基酸组成分析:水介条件 0.4mg/ml 取 250 μl 抽干,溶于 50 μl 98% HCOOH 4℃ 保存。加入新鲜配制的过甲酸 10 μl 放置 -20℃ 2~4h,然后加入 100 μl 水,抽干气相水介(110℃ 22h 1Torr 0.02% 的 -6mol/L HCl) Beckman 6300 型仪器常规分析,委托中科院上海生化所测定。

1.3.4 N-端氨基酸序列分析:仪器为 Applied Biosystems 477A Protein Sequencer 常规测试,委托中科院上海生化所测定。

1.4 抗菌肽的抗菌及抗肿瘤细胞测定

1.4.1 抗菌肽浓度的定量:据 Steiner^[9]的实验结果 1mg/ml Cecropin B 在 2.5mol/L 磷酸钠缓冲液 pH(6.4)中 $\text{OD}_{280} = 1.3$,即抗菌肽浓度 = $\text{OD}_{280}/1.3\text{mg/ml}$,均以此值对抗菌肽浓度进行定量。

1.4.2 抗菌肽活性的测定:我们用下列两种方法测定抗菌肽的抗菌活力。(1)琼脂孔穴扩散法^[10]将处于对数生长期的细菌悬浮液($\text{OD}_{650} = 0.3$) 30 μl 与固体培养基(含琼脂 1%, W/V) 7ml 在 45℃ 左右混合均匀,铺在水平的灭菌培养皿中,待其凝固后 4℃ 保存。使用时皿内等距离打直径为 2mm 的小孔,滴入 2~4 μl 的待测样品液,37℃ 培养 10h,测量

抑菌圈直径,表示测试品的活力大小。(2)抗菌肽液体抑菌浓度的测定^[11]将处于对数生长期的细菌悬浮液($OD_{650}=0.3$) $15\mu\text{l}$ 与液体培养基 $285\mu\text{l}$ 混合,加入 $200\mu\text{l}$ 不同浓度的纯抗菌肽, 37°C 恒温振荡培养 140min ,用冰水浴冷却,然后测定 650nm 的吸光率。以浓度的对数值对相对吸光率作图可得出抑制 50% 菌体所需的抗菌肽浓度。

1.4.3 抗菌肽抗肿瘤细胞的测定: [甲基-3-氢]胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-TdR}$)掺入法: 按 $1.2\times 10^5/\text{ml}$ 接种细胞,培养 12h 后弃原培养液,加含抗菌肽的培养基(空白为纯培养基),作用 12h ,终止培养前 6h ,加 $2\mu\text{mol/L}$ $\text{Ci}/100\mu\text{l}$ $^3\text{H-TdR}$,测定它在细胞中的掺入量。

1.5 抗菌肽的构象初步研究

1.5.1 远紫外圆二色谱(CD)的测定^[5]: $100\mu\text{g}$ 抗菌肽在 1ml 2.5mol/L Na_3PO_4 ($\text{pH}6.4$)中溶解,调节六氟异丙醇(HFP)浓度分别为 1% 、 5% 、 10% 、 15% 、 20% 。用JASCO J—500旋光分光光度计在 25°C 以下测定CD光谱。

1.5.2 4种抗菌肽疏水性的比较: 将HPLC纯化后的4种抗菌肽等量混合,用分析型HPLC分离,在梯度洗脱下得到不同的保留时间(R_t 值),用 R_t 值表示抗菌肽疏水性。

2 结 果

2.1 抗菌肽的手工固相合成

疏水氨基酸都比较容易连接。天冬酰胺和谷氨酰胺为防止其脱水,每步反应都加入HOBt。亮氨酸和精氨酸的接肽反应效率不是很高,用DCC/HOBt复合剂反应一般需 $3\sim 4$ 次。

我们合成的4种抗菌肽其一级序列及理论分子量如下:

Cecropin B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL-NH ₂	3835D
Shiva 1	IK-MPRWRLFRRIDRVGKQIKQGILRAGPAIALVGDARAVG-NH ₂	4242D
ABP 3	KWKVFKKIEKMGRNLREGLVKAGPAIAVLGEAKAL-NH ₂	3850D
WHD	KWKLFKKLEKLGRNLRNGLLKAGPAIAVLGEAKAL-NH ₂	3825D

2.2 合成抗菌肽的分离纯化

合成的抗菌肽粗品经Sephadex G-25柱分离,在进行Formyl的脱除反应时,在波长为 254nm 处和 280nm 处有明显的峰形变化。再上Sephadex G-25柱,再经HPLC分离纯化。抗菌肽的合成、分离纯化及得量见表1。

表 1 4种抗菌肽每一步的产量

Table 1 Yield of four antibacterial peptides for each step

	Cecropin B	Shiva 1	ABP 3	WHD
mBHA resin/mmol	0.0167	0.25	0.0867	0.04175
Theoretical amounts of product/mg	65	1061	331	160
Actual amounts of product mg	35.1	554.1	137	83.2
Chromatography on Sephadex G-25/mg	20.0	347.6	66.0	35.8
Deformylation/mg	14.5	267.1	48.6	26.8
Purification by HPLC/mg	2.61	50.6	6.7	3.2

2.3 抗菌肽的纯度鉴定

2.3.1 HPLC 鉴定 4 种抗菌肽均显示尖锐的单峰(图 1)。小分子量尿素电泳的鉴定为单一条带。

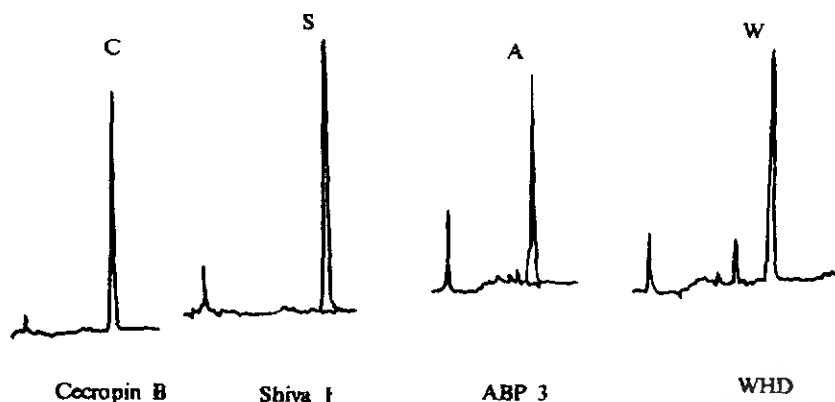


图 1 合成抗菌肽的 HPLC 分析结果

Fig. 1 HPLC analysis of four synthetic cecropins

2.3.2 N-端氨基酸序列与氨基酸组成分析: 对 ABP3 及 WHD 进行氨基酸序列分析的结果表明, 两者 N-端的 10 个氨基酸完全正确。

用归一化法处理氨基酸组成报告中的实际氨基酸数, 得出理论与实际氨基酸数之间的误差均在误差范围内。

2.4 抗菌肽抗菌活力的测定

用琼脂孔穴扩散法测定抗菌肽对 14 株细菌的杀伤或抑制作用(表 2); 用液体抑菌浓度测定抗菌肽对 6 株细菌的半致死剂量浓度(表 3)。其中大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 由瑞典斯德哥

表 2 抗菌肽对不同细菌抑制作用的影响

Table 2 Inhibitory effect of antibacterial peptides on different bacteria

Bacteria strain	Diameter of antibacterial transparent circle/mm*			
	Cecropio B	Shival 1	ABP 3	WHD
<i>Escherichia coli</i> K ¹² D 31	12.5	8	11	12
<i>E. coli</i> (wild type)	10.5	8	10	10
<i>Clostridium perfringens</i>	9	6	6.5	9
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	—	5.5
<i>Proteus vulgaris</i>	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—
<i>Pseudomonas solanacearum</i> H	7.5	5.5	7	8.5
<i>P. solanacearum</i> Jing 1	9	6	8	9
<i>P. solanacearum</i> 862427-1	7.5	5.5	6	8.5
<i>P. solanacearum</i> Japan	8	6	7	8.5
<i>E. coli</i> (patho genic type)	9.5	7	8.5	9
<i>Salmonella typhi</i>	10	6	9.5	9.5
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	—	—	—	6
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	11	7	9.5	9.5

* "Concentration of cecropins in each hole is 1μg/μl.

尔摩大学 Boman 教授赠送;野生型大肠杆菌、产气标菌由中国科学院上海植物生理研究所白永延教授赠送;四种植物病原菌青枯病菌由中国农业科学院物生技术研究中心贾士教授赠送;其他的菌种及肿瘤细胞由南京军区军事医学研究所胡云龙先生提供。

表 3 抗菌肽对不同细菌的 50% 的抑制浓度
Table 3 50% inhibitory concentration of antibacterial peptides to different bacteria

Bacteria strain	50% inhibitory concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	Cecropin B	Shiva 1	ABP 3	WHD
<i>E. coli</i> K ¹² D ³¹	0.12	0.91	0.30	0.18
<i>E. coli</i> (wild type)	0.14	4.3	0.98	0.38
<i>C. perfringens</i>	2.6	5.2	0.8	3.2
<i>B. subtilis</i>	70	7100	70	20
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-

2.5 抗肿瘤细胞活力的研究

抗菌肽对白血病细胞及肺癌细胞的杀伤作用(表 4),细胞由南京军区军事医学研究所胡云龙先生提供。

表 4 抗菌肽对白血细胞及肺癌细胞的杀伤作用
Table 4 Inhibitory effect of four antibacterial peptides
on ³H-TdR incorporation into tumor cell lines

Cell line	Inhibition of ³ H-TdR incorporation/%			
	Cecropin B	Shiva 1	ABP 3	WHD
Leukemia cell K 562	48.27	45.90	43.28	57.34
Lung cancer cell A 549	88.5	85	82	89

* The concentration of cecropins is 1 mmol/L.

从以上结果可以看出:Cecropin B、ABP 3、WHD 对大部分测试细菌的抑制作用相近,其中尤以 WHD 和 Cecropin B 较佳。Shiva 1 相对这 3 种抗菌肽活力较弱,与 Jaynes 的报道不尽一致,这可能和所选用的测试菌种有关;在抗癌细胞作用方面,从所测的细胞株来看 WHD 与 Cecropin B 具有较高的活力。

2.6 抗菌肽的构象初步研究

2.6.1 远紫外 CD 谱的测定:ABP 3 在纯的磷酸钠缓冲液中呈无规则卷曲,加六氟异丙醇(HFP)至 5% 浓度时溶液构象中就出现了 α 螺旋成分,随着其浓度的增加, α 螺旋成分也不断增加,至 15%~20% HFP 时螺旋度达到最高。

螺旋度的计算公式为 $f\alpha = ([\theta]_{208} - 4000)/(33000 - 4000)$,其中 $f\alpha$ 是肽中螺旋所包含的残基数与整个分子残基数的百分比,即螺为度; $[\theta]_{208}$ 是波长为 208 纳米时的平均残基克分子椭圆值^[12]。根据这个公式计算得到 4 种抗菌肽的螺旋度,即 Cecropin B 53%、Shiva 1 65%、ABP 3 84%、WHD 77%。ABP 3 的核磁共振谱的研究结果与 CD 谱结果基本一致(另文发表)。

2.6.2 抗菌肽的疏水性:我们比较了 4 种抗菌肽在用 HPLC 梯度洗脱,得到不同的保留

时间(见表 5)。由引提示,这 4 种菌肽的疏水性由大到小依次为:

WHD>Shiva 1>ABP 3>Cecropin B

表 5 梯度洗脱的保留时间

Table 5 Retention time (Rt) in elution gradients

Program		Antibacterial peptides		Rt/min	Concentration of acetonitrile/%
t/min	Flow rate/ml·min ⁻¹	Acetonitrile/%	Cecropin B	39.1	34.1
0.0	1.0	0	Shival 1	42.0	37.0
5.0	1.0	0	ABP 3	40.0	35.0
55.0	1.0	50	WHD	47.3	42.3

3 讨 论

固相合成多肽通常选用的树脂为 Pam 树脂,它在 HF 切肽时羧基端成自由羧基,而天然抗菌肽的羧基都是酰胺化的,失去这个酰胺基,其活力将下降^[14]。虽然可以用氨解的方法产生羧基端的酰胺,但氨解的同时也使天冬氨酸、谷氨酸的侧链羧基酰胺化,整个分子的净电荷将改变。所以,我们采用 mBHA 树脂,这是目前广泛使用的一种能够多元解离的树脂^[15]。用氯化氢(HF)切肽时。反应产率高,而且肽链的羧基端仍保持酰胺化。

4 种抗菌肽 Cecropin B、Shiva 1、ABP 3、WHD 在抗菌作用均表现了一定的活性,特别是 Cecropin B 及 WHD 显示了较强的抗菌活力。Cecropin B 本身就是天然抗菌肽中活性最高的^[2]。而 WHD 的结构就是受 Kaiser 和 Kezdy 设计^[5]的启发,经过对 Cecropin B 进行类似的改造后设计而成的,即置换疏水面上所有疏水氨基酸为亮氨酸,置换碱性氨基酸为赖氨酸,而亮氨酸侧链上的丁基与膜脂成分中的碳氢链的相互作用是稳定 WHD 在膜上的结构、增强两者相互作用的重要原因。Shiva 1 的设计者曾报道其抗菌活力强于 Cecropin B^[3],但我们的实验结果表明,就抗菌活力而言,它明显低于其它 3 种抗菌肽,这可能与所选测试菌的不同有关。

进行新的抗菌肽的设计和改造,寻求一些具有抗肿瘤细胞和病毒、真菌,高效抗细菌的新型的抗菌肽是很有意义的工作。在农业上,将抗菌肽基因转入植物中以提高植物的抗病能力,这将为植物的抗病育种开辟一条新路。抗菌肽在医药和农业上都有很大的开发应用前景。

致 谢 本工作得到南京军区军事医学研究所胡云龙先生的通力合作,一直受到贾士荣教授的关注和指导,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al.* Eur J Biochem, 1980, 106:7~16.
- [2] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A *et al.* Nature, 1981, 292:246~248.
- [3] Jaynes J M, Burton C A, Barr S B *et al.* FASEB J, 1989, 2:2878~2883.
- [4] 王三山 徐 梅,甘人宝等. 动物学研究, 1993, 14(增刊):120~127.
- [5] Kaiser E T, Kezdy F J. Science, 1984, 223:249~255.
- [6] 黄惟德、陈常庆. 多肽合成. 北京:科学出版社, 1985, pp. 7~8.

- [7] Merrifield R B, Vizioli L D, Boman H G. *Biochemistry*, 1982, **21**:5020~5031.
- [8] Swank R T, Munkers K D. *Anal Biochem*, 1971, **39**:462~477.
- [9] Steiner H. *FEBS Letters*, 1982, **137**:283~287.
- [10] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H *et al.* *Eur J Biochem*, 1982, **172**:207~217.
- [11] Tu Y Z, Qu X M, Xu T S. *Science in China*, 1989, **32**:1072~1081.
- [12] 鲁子贤. 蛋白质化学(责任编辑赵甘泉), 北京:科学出版社, 1981.
- [13] Merrifield R B. *J Am Chem Soc*, 1963, **85**:2149~2154.
- [14] Matsumoto N, Okada M, Takahashi H *et al.* *Biochem J*, 1986, **239**:717~722.
- [15] Andreu D, Merrifield R B, Steiner H G. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1983, **80**:6475~6479.

Study on Solid-phase Synthesis, Purification and the Relation Between Structure and Function of the Antibacterial Peptides

Lu Yingjing Wang He Qu Xianming

(Shanghai Research Centre of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

Abstract Four antibacterial peptides Cecropin B, Shiva 1, ABP 3 and WHD were manually synthesized by the stepwise solid-phase method following DCC/HOBt protocol. The C-terminal of each peptide was in the form of amide. After being desalted on a Sephadex G-25, the formyl group of the protected tryptophan was removed by 0.03mol/L hydroxylamide (pH9.0). The peptides were finally purified by HPLC and showed antibacterial activity against several Gram-positive and Gram-negative bacteria. WHD is the best one in the four peptides in term of possessing relatively higher lytic ability. WHD also showed high inhibitory ability against some kinds of human cancer cells. In addition, the structures of the four antibacterial peptides were analyzed by CD spectrum.

Key words Antibacterial peptides, solid-phase synthesis, antibacterial activity