

# 霍乱肠毒素 A<sub>2</sub> 亚单位15肽 (10—24) 的合成 及其有关生物活性初步测定

袁 佩 娜

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

A. Dodin G. Le Thuillier

(法国巴斯德研究院霍乱弧菌实验室, 巴黎)

本文根据 Merrifield 固相方法, 人工合成了霍乱肠毒素 A<sub>2</sub> 亚单位第 10—24 位氨基酸序列。合成中采用树脂-氯甲烷为载体, 双环己基碳化二亚胺 (D.C.C.I) 作为连结剂。最终合成产物经过高压液相氨基酸分析证实: 含有 A<sub>2</sub> 亚单位第 10—24 位十五个氨基酸组成成分, 经初步活性测定证实有抗原性; 能激发家兔产生特异性抗体, 在琼脂双扩散试验中能产生抗原抗体特异性沉淀反应。它不具有改变血管通透性的毒性活力, 小鼠皮肤反应阴性。肠样结扎试验显示: 不引起肠液贮留; 当与 B 亚单位结合后, 在肠内可抑制霍乱毒素的作用。

**关键词** 霍乱肠毒素; A 亚单位、B 亚单位; 氨基酸序列; 抗原性

霍乱肠毒素 (CT) 由 A 亚单位和五个相同 B 亚单位聚合而成 (图 1), 这两部分以非共价键形式相连接。B 亚单位能与小肠粘膜上皮细胞膜受体 (神经节苷酯——GM<sub>1</sub>) 结合, 使 A 亚单位穿入细胞内, 激活环腺苷酶系统, 引起环磷酸腺苷增加, 而使人致泻, 所以霍乱肠毒素毒性是通过 A 亚单位来体现的<sup>[1]</sup>。

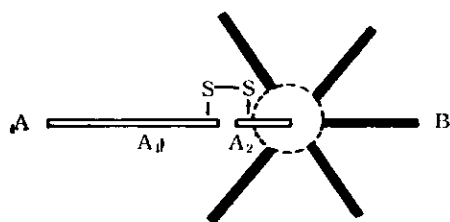


图 1 霍乱毒素结构图

Fig. 1 Schema of the structure of the cholera toxin

A 亚单位经酶还原, 其二硫键被裂解后, 成为  $\alpha$ 、 $\gamma$  两肽链, 也称 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 亚单位。

根据 Duffy 等<sup>[2]</sup>报道霍乱毒素 A 亚单位分子量是 29500, 其中 A<sub>1</sub> 是 24000, A<sub>2</sub> 是 5500。并已知后者由 46 个氨基酸组成 (图 2, 图中上排为 CTA<sub>2</sub>, 下排为 LTA<sub>2</sub>), 其中约三分之一与大肠杆菌肠毒素 A<sub>2</sub> 亚单位的一级结构相同<sup>[3]</sup>。

我们研究 A 亚单位结构, 在生理学方面, 试图以人工合成方法得到一个最短肽链, 而这部分结构可以成为环磷酸腺苷的激活剂。在预防霍乱方面, 可进一步阐明 A 亚单位的毒性部位; 探讨能抑制天然毒素固定的最短氨基酸序列, 以便进一步改进霍乱免疫制剂。另一方面, 由于大肠杆菌肠毒素 (LT) 和霍乱毒素 (CT) 之间有相似结构和免疫性<sup>[3]</sup>, 因此可导致能抵抗两者感染的研究。

Chou 和 Fasman<sup>[4]</sup> 指出, 在 A<sub>2</sub> 亚单位肽链中存在两个螺旋结构区域: 即第

本文于 1984 年 5 月 25 日收到。

此项工作系在法国巴斯德研究院霍乱弧菌实验室完成。

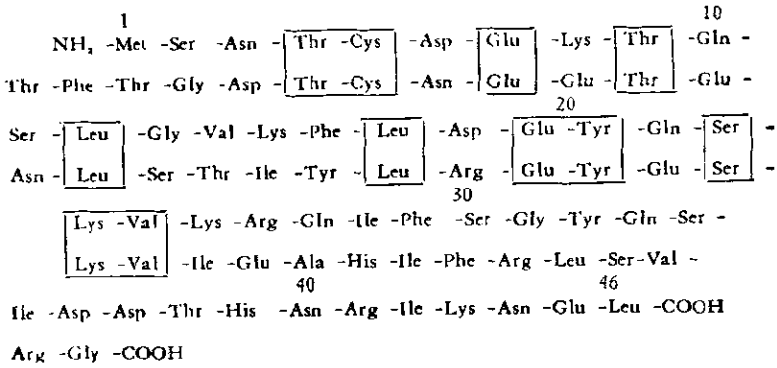


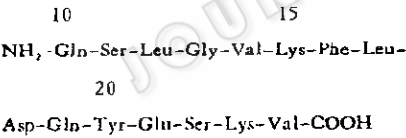
图 2 霍乱毒素 A<sub>2</sub> 亚单位和大肠杆菌肠毒素 A<sub>2</sub> 亚单位的一级结构

Fig. 2 CTA<sub>2</sub> and LTA<sub>2</sub> primary structure

5—12 位氨基酸和第 15—24 位氨基酸, 这些区段都是亲水的<sup>[5]</sup>, 也正是与 LT 具共同氨基酸排列部分。我们根据 Merrifield<sup>[6]</sup>介绍的固相法, 首次合成了霍乱毒素 A<sub>2</sub> 亚单位第 10—24 位氨基酸序列 (以下简称 CTA<sub>2</sub>-15 肽), 并初步测定了一些有关的生物活性。

材料和方法

(一) A<sub>2</sub> 亚单位第 10—24 位氨基酸序列<sup>[17]</sup>



(二) 合成用主要试剂及溶液

合成中所需氨基酸的 α 氨基由 t-BOC (3-丁氧基碳酰) 作暂时保护; 其侧链由 Bzl (苯甲基) 作长期保护。t-BOC-L-氨基酸均为美国 Chemical Dynamic Corporation 商品, 保存于 4℃。

载体: 树脂-氯甲烷 (Resin-CH<sub>2</sub>Cl), 由 Bio-Rod Laboratories 提供, 规格 200—400 目, 含量 1.3mN/g, 保存于 4℃。

连接剂: D. C. C. 1 (双环己基碳化二亚胺), 保存于 4℃。

二甲基甲酰胺 (DMF)。1-羟基苯并三唑 (HOBt)。

生物胶 Bio-Gel P-4, 200—400 目, Bio-Rod Laboratories 提供。

- A. 溶液: 三氟醋酸/二氯甲烷, 需新鲜配制。
- B. 溶液: 异丙基乙胺/二氯甲烷, 新鲜配制。
- C. 溶液: 二氯甲烷。
- D. 溶液: 乙醇。

(三) 合成仪

自动合成仪, 系 Université de Nancy-CHU ST-Antoine 制成。仪器上的玻璃反应管 (图 3) 是

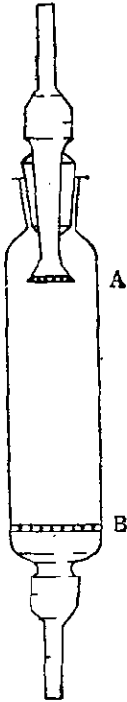


图 3 合成反应管  
Fig. 3 Reactor cell

进行全部合成反应的重要装置。反应管上下各有一小室系红外监测, (图 3 中的 A 和 B) 控制着反应过程中液体的量。

#### (四) 合成方法

参照 Merrifield<sup>[4]</sup> 介绍的固相法, 树脂-氯甲烷为载体。按图 4 依次连结。

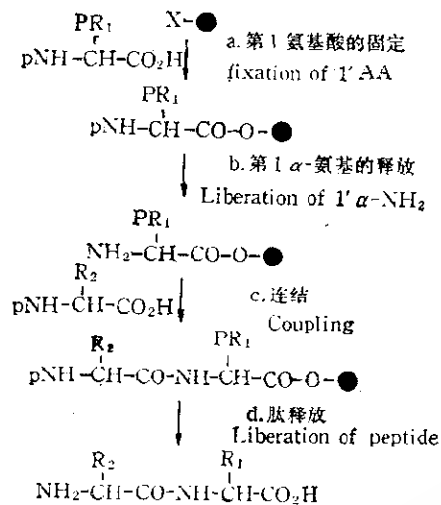


图 4 固相合成步骤

Fig. 4 Principle of synthesis in solid phase

●: 固相载体 Solid support  
 P: 长期性侧链保护剂 Permanent protection lateral  
 p: 暂时性保护剂 temporal protection

CTA<sub>2</sub>-15 肽的合成由第 24 位缬氨酸开始, 先固定在树脂-CH<sub>2</sub>Cl 上, 然后第 23、22……依次进行, 每种氨基酸加入量根据 Gisin 试验<sup>[17]</sup>计算, 但为保证连结反应, 可以倍量加入。

1. 连结: 称取所需量的已封闭氨基酸 (BOC-AA) 溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中。称取等量的 D. C. C. I. 和 HOBt 溶于 DMF 中。然后一并加入自动合成仪的反应管中, 摇动 2 小时以上, 再加入 C、D 溶液交替洗涤两次后, 采用茚三酮反应<sup>[18]</sup>测定连接是否成功, 若反应显示无色即为阴性, 表示连接成功, 可进行下一步; 若反应有兰色显示, 即为阳性, 表示连接未成功, 需重新开始。

2.  $\alpha$ -氨基释放: 先经 A 溶液作用 30 分钟, C 溶液洗四次; 再用 B 溶液中和 5 分钟, C、D 溶液分别洗涤。此时已去除暂时保护剂 (BOC), 释放出  $\alpha$ -氨基, 茚三酮反应转阳性, 显示兰色, 这样

可进行一个氨基酸的连结。

3. 合成肽的释放: 合成结束时, 得到的最终产物为肽-树脂的混合物, 经真空干燥, 此混合物加入氟化氢 (10% V/V) 在低温下进行水解反应, 经乙醚充分洗涤后, 用 0.5M 醋酸抽滤提取其中合成肽部分, 冻干。

4. 提纯: 在 1 × 100cm 的 Bio-Gel P<sub>4</sub> 凝胶柱中进行提纯。洗脱液为 0.5M 醋酸, 最后得 I、II、III、IV、V 五个部分。

5. 氨基酸成分分析: 各提纯部分 (III、IV、V) 经水解, 采用 Waters 高压液相氨基酸测定仪进行氨基酸成分测定。

#### (五) 生物活性测定方法

##### 1. 琼脂双扩散试验:

制备家兔免疫血清——首次免疫 1mg 的合成 CTA<sub>1</sub>-15 肽加入 1ml 福氏完全佐剂, 注入家兔背部皮内, 以后每周一次, 每次 1mg CTA<sub>1</sub>-15 肽 (不加佐剂) 共三次, 分别肌肉、皮下、静脉注射, 末次注射后 15 天采血, 分离出血清。然后, 按 Ouchterlony 方法进行琼脂双扩散试验。试验中所用 CT 由 Sigma 提供; 抗毒素即为此 CT 免疫的家兔血清。

##### 2. 小鼠皮肤反应:

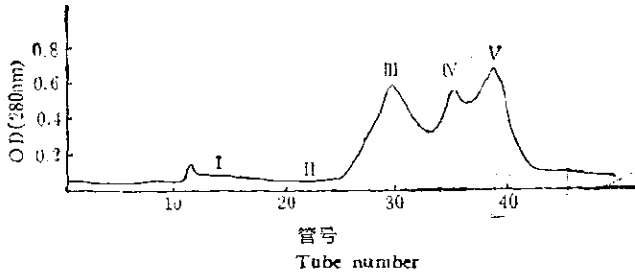
体重 35—40g 健康 Swiss 小鼠六只。

样品: CTA<sub>1</sub>-15 肽 1mg/ml, CT 1mg/ml 分别稀释为 5 倍、10 倍、20 倍三个浓度。每只小鼠背部皮内分三处注射, 此三处分别注入同一浓度的两个样品和对照 (生理盐水) 0.1ml, 每浓度为两只小鼠。于 18 小时观察局部皮肤反应: 于 48 小时切开背部皮肤, 由皮肤内面观察。凡局部无反应则 (-); 发红范围 < 8mm 为 (+); 发红范围 > 8mm 为 (++)。

##### 3. 小鼠肠样结扎试验:

参照 Finkelstein 等<sup>[19]</sup>介绍的方法, 采用 16—18g 健康 C<sub>3</sub>H 小鼠, 每试验组 3 只, 共 24 只。用乙醚麻醉小鼠, 打开腹腔, 在近胃幽门约 2cm 处结扎 2—3cm 小肠肠段, 并注入 0.1ml 试验样品, 然后关闭腹腔, 缝合腹部伤口, 18 小时后打开腹腔, 观察结扎段是否有积液, 并游离此肠段, 称重、量长度, 求重量与长度比值 (W/L)。

试验样品: CTA<sub>1</sub>-15 肽; 霍乱毒素 (CT); A 亚单位 (CTA); B 亚单位 (CTB); 生理盐水作

图 5 合成肽的生物胶 P<sub>4</sub> 层析图Fig. 5 Bio-gel P<sub>4</sub> chromatography of synthetic peptide

为对照品。

试验按下列各组进行:

(a) 肠袢内注入 100 $\mu$ g/0.1ml 的 CT。(b) 肠袢内注入 100 $\mu$ g/0.1ml 的 CTB。(c) 肠袢内注入 100 $\mu$ g/0.1ml 的 CTA<sub>2</sub>。(d) 先在肠袢内注入 100 $\mu$ g/0.1ml CTB 10 分钟后在原部位注入 1mg/0.1ml 的 CTA<sub>2</sub>。(e) 先在肠袢内注入 1mg/0.1ml 的 CTB, 10 分钟后在原处注入 100 $\mu$ g/0.1ml 的 CT。(f) 肠袢内注入 1mg/0.1ml CTA<sub>2</sub>-15 肽。(g) 先在肠袢内注入 100 $\mu$ g/0.1ml CTB, 10 分钟后在原处注入 1mg CTA<sub>2</sub>-15 肽。(h) 先在肠袢内注入 1mg/0.1ml CTB + 1mg/0.1ml CTA<sub>2</sub>-15 肽, 10 分钟后在原处再注入 100 $\mu$ g/0.1ml CT。(i) 对照组, 即在结扎肠段内注入 0.1ml 生理盐水。

## 结果和讨论

### (一) 合成 CTA<sub>2</sub>-15 肽提纯和氨基酸组成分析

按上述方法得到的终合成物, 经去除树脂后, 在 Bio-Gel P<sub>4</sub> 柱上进行层析过滤得 I、II、III、IV、V 五个部分(图 5), 冻干后, 各部分含量很不相同, III 峰约占 60%, IV 峰约占 25%。经 HPLC 氨基酸分析仪测定证实 III 峰为提纯的 CTA<sub>2</sub>-15 肽部分, 它含有第 10—24 位序列的全部氨基酸组成。即:

Asp(1), Ser(2), Gln(3), Gly(1), Val(2),  
Leu(2), Tyr(1), Phe(1), Lys(2)。

### (二) 体外免疫活性测定

图 6 显示了 CTA<sub>2</sub>-15 肽、抗 CTA<sub>2</sub>-15

肽家兔血清, CT 及抗 CT 在琼脂双扩散试验中的相互关系。由图可见抗 CTA<sub>2</sub>-15 肽家兔血清与 CT 能产生特异沉淀反应(即②孔与③孔间有沉淀线), 说明用 CTA<sub>2</sub>-15 肽免疫的家兔血清能与霍乱毒素中某一抗原成分产生特异反应。即人工合成的 CTA<sub>2</sub>-15 肽是霍乱毒素的一个组成部分; 它具有抗原性, 免疫家兔后能激发特异性抗体产生。但 CTA<sub>2</sub>-15 肽是小短肽链, 分子量很小, 抗原性也很弱, 所以在琼脂双扩散中, 特别当抗原或抗体浓度不足时, 不能显示阳性结果。正如图中所示, ③和④孔加入的都是 CT, 前者与抗 CTA<sub>2</sub>-15 肽兔

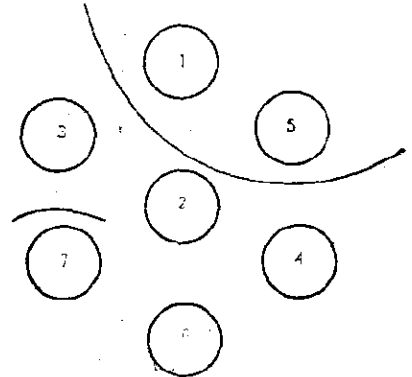


图 6 琼脂双扩散图

Fig. 6 Double gel diffusion analysis

注: ①⑤抗霍乱毒素家兔血清 Antiserum prepared against CT

③毒素 CT ④稀释毒素 Diluted CT

⑥⑦抗 CTA<sub>2</sub>-15 肽家兔血清 Antiserum prepared against CTA<sub>2</sub>-15 peptide

② CTA<sub>2</sub>-15 肽 CTA<sub>2</sub>-15 peptide

表 1 CTA<sub>2</sub>-15 肽与 CT 的小鼠皮肤反应结果Table 1 Comparison between CTA<sub>2</sub>-15 peptide and CT for the skin test in mice

样品 Sample	时间 Time 浓度 Conc.	18 小 时 (h)			48 小 时 (h)		
		1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20
CTA <sub>2</sub> -15 肽 Peptide (1mg/ml)		-	-	-	+	±	-
CT (1mg/ml)		+	+	-	++	++	+
对照 Control		-	-	-	-	-	-

血清发生沉淀反应。而后者为稀释后毒素,未见沉淀线出现,这是由于稀释毒素浓度低与相应抗体不能起沉淀反应。同理,抗 CTA<sub>2</sub>-15 肽兔血清与 CTA<sub>2</sub>-15 肽也不能出现沉淀线,抗 CT 与 CTA<sub>2</sub>-15 肽也显示阴性结果。而抗 CT 与 CT 则有明显沉淀反应出现(③孔对①孔,④孔对⑥孔)。

### (三) 体内活性测定

#### 1. 小鼠皮肤反应观察

很早以前, Craig<sup>[1]</sup> 利用皮肤兰斑反应(BD)来测定 CT 的毒力,并称这种毒性活力为血管渗透因子(PF)。曾有人将毒素经福尔马林脱毒变成类毒素后,再作 BD 试验,则为阴性反应,不再显示毒性活力,说明此 PF 的活性部位不在 B 亚单位,仍在 A 亚单位。

本试验用 Swiss 小鼠作了简单的皮肤反应观察,结果见表 1。0.1 ml 不同浓度的 CTA<sub>2</sub>-15 肽注射小鼠皮内 18 小时后,局部不出现任何反应;而同剂量 CT 注入后,浓度高者反应明显,但并不严重:(+), (±) 或 (-)。48 小时后反应逐渐加重,局部发红区域扩大,大部分发红区直径在 8mm 以上(5 倍、10 倍稀释度)。即使当样品稀释至 20 倍时,局部皮肤内面仍可见充血发红现象。而 CTA<sub>2</sub>-15 肽组小鼠,除浓度最高者(5 倍稀释)呈现(+)外,其余均为阴性。

由此初步可见:CTA<sub>2</sub> 第 10—24 位序列不具有改变血管渗透性的毒性活力。

#### 2. 小鼠肠袢结扎试验

小肠粘膜上皮细胞中的环腺苷酶被激活后,使环磷酸腺苷浓度增高,引起肠液分泌增加。家兔或小鼠的肠袢试验即为观察霍乱肠毒素毒力较好的动物模型。本试验利用 C<sub>3</sub>H 小鼠进行肠袢结扎试验测定 CTA<sub>2</sub>-15 肽的毒性,并与 CT, CTB, CTA 等作比较,并以被结扎肠段的重量和长度比(W/L),即每 cm 肠段的 mg 重量来表示;与对照组相比,W/L 值越大,积液越多。表 2 所显示各组数值为三只小鼠的平均值。试验中得到对照小鼠的平均值为 64mg/cm。

当注入霍乱毒素时(a 组),可在局部观察到积液充盈肠袢内,其 W/L 为 126.7 mg/cm,明显高于对照组 W/L 值。当单独注入合成肽 CTA<sub>2</sub>-15 肽(f 组),B 亚单位(b 组)或 A 亚单位(c 组)时,其 W/L 为 61mg/cm、67mg/cm 或 62mg/cm,与对照组无明显差异,局部无积液,说明均不产生引起肠液贮留的毒性作用。d 组即先注入 B 亚单位,然后再注入 A 亚单位,结果局部有积液、W/L 为 116.6mg/cm,高于对照组,说明两者加在一起具有完整毒素的毒性作用。当先注入 B 亚单位,再注入合成 CTA<sub>2</sub>-15 肽时,W/L 为 61mg/cm,局部未

表 2 C<sub>3</sub>H 小鼠肠袢结扎试验结果Table 2 The assay in ligated intestinal loops in C<sub>3</sub>H mice

组 别 No.	注 入 样 品 Preparation for injection	长度与积液量之比 Ratio of fluid to length W/L (mg/cm)
a	霍乱毒素 CT	126.7
b	B 亚单位 CTB	67
c	A 亚单位 CTA	62
d	先 B 亚单位, 10 分钟后 A 亚单位 CTB. then after 10 minutes CTA	116.6
e	先 B 亚单位, 10 分钟后霍乱毒素 CTB. then after 10 minutes CT	121.7
f	合成 A <sub>2</sub> 亚单位 15 肽 CTA <sub>2</sub> -15 peptide	61
g	先 B 亚单位, 10 分钟后合成 15 肽 CTB. then after 10 minutes CTA <sub>2</sub> -15	63.2
h	先 B 亚单位 + 合成 15 肽, 10 分钟后霍乱毒素 CTB + CTA <sub>2</sub> -15 peptide, then after 10 minutes CT	67
i	对照 Control	64

见积液(见 g 组)。而当先注入 B 亚单位 + CTA<sub>2</sub>-15 肽, 再注入霍乱毒素时 (h 组), W/L 值为 67mg/cm, 与对照组接近。说明合成肽 CTA<sub>2</sub>-15 肽与 B 亚单位结合, 可抑制霍乱毒素引起的肠液滞留作用。若这种抑制作用对大肠杆菌肠毒素也存在的话, 那么就有可能进一步研究一个新的具有双重免疫性 (既对霍乱也对大肠杆菌引起的腹泻) 的预防制剂。

## 参 考 文 献

[1] Holmgren, J.: *Nature*, 292: 413, 1981.

- [2] Duffy, L. K.: *J. Chemistry*, 256: 23, 1981.  
 [3] Spicer, E. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 50-54, 1981.  
 [4] Chou, P. Y. and G. D. Fasman.: *Advances in Enzymol.*, 47: 45, 1978.  
 [5] Hopp, T. P. and K. R. Woods.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, 78: 3824, 1981.  
 [6] Merrifield, R. B.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 85: 2149, 1963.  
 [7] Gsin.: *Anal. Chem. Acta.*, 58: 248, 1972.  
 [8] Kaiser.: *Anal. Biochem.*, 39: 50-55, 1970.  
 [9] Koichiro, and Finkelstien, R. A.: *J. of Infectious Diseases* 125(6): 647-655, 1972.  
 [10] Craig, J. P.: *Nature*, 20: 614-616, 1965.  
 [11] Delmas, A. et al.: *Brevet Francais on*, 82 09 167, 1982.

## SYNTHESIS OF 15 PEPTIDE OF THE SUBUNIT A<sub>2</sub>(10—24) OF THE CHOLERA TOXIN AND INITIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

Yuan Peina

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Product, Beijing)

A. Dodin G. Le Thuillier

(Pasteur Institute, Paris.)

This communication describes an amino acid sequence of the subunit A<sub>2</sub>(10—24) of the cholera toxin, that was synthesized on solid phase by Merrifield method. In synthetic procedure, the resin-CH<sub>2</sub>Cl was used as solid support and D. C. I. (Dicyclohexylcarbodiimide) was the coupling reagent. The final synthetic product was shown to have the desired 15 amino acids of subunit A<sub>2</sub>(10—24) on HPLC. Some of the biological activity tests indicated: it was an antigen which induced the formation of specific antibody after an immunization in rabbit; the specific precipitation reaction of antigen-antibody

was visualized in double gel diffusion; the skin test showed negative result and this expressed that it had not the ability of changing vessel permeability. The assay in ligated intestinal loops in C<sub>3</sub>H mice showed: the synthetic pentadecapeptide did not induce the accumulation of intestinal liquid; but when associating with B subunit, it could inhibit the accumulation of intestinal liquid by the action of cholera toxin.

### Key words

Cholera toxin; A subunit, B subunit;  
Amino acid sequence; Antigenicity