



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115043924 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 27

(21) 申请号 202210465719.7

A61K 38/14 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.29

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 112625107 A, 2021.04.09

申请公布号 CN 115043924 A

CN 106188265 A, 2016.12.07

CN 113735956 A, 2021.12.03

(43) 申请公布日 2022.09.13

Jianguang Lu et al.- and Unnatural

(73) 专利权人 苏州大学

Amino Acid Substituted Antimicrobial

地址 215000 江苏省苏州市吴中区石湖西路188号

Peptides With Improved Proteolytic

Resistance and Their Proteolytic

(72) 发明人 王义鹏 欧阳建红 郝伟静 汪旭

Degradation Characteristics.Frontiers in

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙) 32257

Microbiology.2020,第11卷摘要,第2页左栏第3

段-右栏第1段,第8页右栏第1段-第9页左栏最后1段,第15页右栏第3段,表4.

专利代理师 王玉仙

Xue Qiao et al. Diversity,

(51) Int.Cl.

immunoregulatory action and structure-

C07K 14/46 (2006.01)

activity relationship of green sea turtle

A61K 38/17 (2006.01)

cathelicidins.Dev Comp Immunol.2019,第98

A61P 31/04 (2006.01)

卷表2.

A61P 29/00 (2006.01)

审查员 毕晴

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/43 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

A61K 38/12 (2006.01)

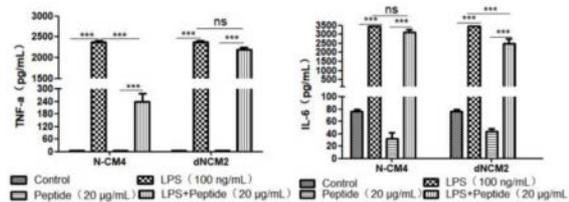
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种改造体抗菌肽及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种改造体抗菌肽及其应用,该改造体抗菌肽通过将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的抗菌肽进行改造得到,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明的改造体抗菌肽具有广谱高效的抗菌活性、极强的抗炎活性和抗生物膜活性,与传统的抗生素具有协同抗菌作用,此外具有分子量小、结构简单、溶血活性低、稳定性高、制备方法简单等有益特点,为抗炎剂、抗菌剂的制备以及在防腐剂、动物饲料添加剂、化妆品添加剂等下游领域中有巨大的潜在应用前景。



1. 一种改造体抗菌肽在制备抗菌剂中的应用,其特征在于:所述改造体抗菌肽的氨基酸序列为:Phe¹ Lys² Lys³ Val⁴ Arg⁵ Lys⁶ Gln⁷ Leu⁸ Gly⁹ Arg¹⁰ Val¹¹ Leu¹² Arg¹³ His¹⁴ Ser¹⁵ Arg¹⁶ Ile¹⁷ Thr¹⁸ Val¹⁹ Gly²⁰ Gly²¹ Arg²² Met²³ Arg²⁴ Phe²⁵,其中,精氨酸为D型精氨酸,赖氨酸为D型赖氨酸。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的抗菌剂用于抑制革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述的革兰氏阳性细菌包括金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、产气荚膜梭菌或表皮葡萄球菌。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述的革兰氏阴性细菌包括大肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、福氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、溶藻弧菌或哈维氏弧菌。

5. 一种抗菌药物组合物,其特征在于:所述的抗菌药物组合物包括改造体抗菌肽和抗生素;

所述改造体抗菌肽的氨基酸序列为:Phe¹ Lys² Lys³ Val⁴ Arg⁵ Lys⁶ Gln⁷ Leu⁸ Gly⁹ Arg¹⁰ Val¹¹ Leu¹² Arg¹³ His¹⁴ Ser¹⁵ Arg¹⁶ Ile¹⁷ Thr¹⁸ Val¹⁹ Gly²⁰ Gly²¹ Arg²² Met²³ Arg²⁴ Phe²⁵,其中,精氨酸为D型精氨酸,赖氨酸为D型赖氨酸;

当抗生素选自美罗培南或多粘菌素B时,抗菌药物组合物用于抗鲍曼不动杆菌;当抗生素选自氨苄青霉素或万古霉素时,抗菌药物组合物用于抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

一种改造体抗菌肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种改造体抗菌肽及其应用。

背景技术

[0002] 抗菌肽是由基因编码在核糖体内合成的多肽,不同种类的抗菌肽通常有共同的特点:短肽,强阳离子性,热稳定性好,分子质量小,无药物屏蔽且对真核细胞毒性小。当今,抗菌肽已经可以由原核生物到人类的大部分有机生物体中成功分离和分类。抗菌肽通常作用于细菌,在真核生物的天然免疫方面发挥着重要作用,被认为是古代进化中哺乳动物体内有效保留的免疫分子。因此,抗菌肽作为广泛存在于自然界生物中的一类多肽物质,可作为生物机体的第一道防线,能够抵抗病原体的侵害。抗菌肽具有抗细菌、真菌、病毒,抑杀癌细胞等多种生物活性,且不易产生抗药性。

[0003] 目前抗菌肽在医学上的应用取得了一些令人满意的成果,已经有许多新型药物逐步迈入医药市场。例如,应用两栖类抗菌肽magainin开发的抗菌肽药品MAI278已经接近完成Ⅲ期临床试验,对病毒和肿瘤细胞显示较好的杀伤作用。daptomycin是一种阴离子抗菌肽,由CubitPharmaceuticals公司研发,2003年9月由美国食品与药物管理局批准上市,其可用于金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌引起的皮肤感染和脓毒症的治疗。Li等对鼠源Bin1b抗菌肽基因功能的研究取得突破性进展。这是目前发现的第一个与男性生殖系统炎症相关的功能基因,第一次证实了附睾具有免疫系统。MX-226(CPI-226)是一个分离自牛的indolicidins抗菌肽,已完成Ⅲb期临床试验,可用于局部阻止或降低中心静脉导管相关的血液感染,显示了良好的应用前景。plectasin(菌丝霉素)是从一种子囊菌中分离出来的抗菌肽,其对肺炎链球菌具有较好杀菌活性,也可以抑制真菌和病毒生长,2007年已完成对plectasin的临床前期研究。除此之外,抗生素作为饲料添加剂应用于动物生产中,对畜牧业的发展起了重要作用,但其在动物体内和动物产品中的残留,以及病原菌产生的抗药性问题,对人类的健康和环境产生了负面的影响。可见,抗菌肽作为最有希望代替传统抗生素的物质,在医药行业和食品添加剂等领域有良好的应用前景。因此,本发明旨在针对绿海龟(*Chelonia mydas*)抗菌肽Cm-CATH2进行改造,以期提供一种新的抗菌肽,作为新一代抗菌药物的有力备选。

[0004] 中国专利CN201610585747.7公开了一种抗微生物肽Cm-CATH2,该抗微生物肽由Cm-CATH2改造得到,该抗微生物肽具有良好的抗菌活性;中国专利CN202011319757.9公开了抗菌肽Cm-CATH2防控谷物中层出镰孢菌中的应用;中国专利CN202011319760.0公开了一种抗菌肽Cm-CATH2抑制海产品中副溶血性弧菌的应用。以上专利均表明抗菌肽Cm-CATH2对细菌有较好的抑制作用,但均未涉及结构改造和抗炎效果的研究。因此,本发明期望提供一种同时具有抗菌和抗炎效果的抗菌肽Cm-CATH2改造体,以作为潜在的抗菌抗炎药物。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明通过两步结构改造,首先对SEQ ID NO.1所示抗菌肽

进行肽链缩短得到了一系列缩短肽,然后对缩短肽进行了抗菌、抗炎、以及溶血活性研究,从中筛选出抗菌活性、抗炎活性较好,溶血活性较低的抗菌肽,然后将其中的Arg和Lys替换成非天然的D型氨基酸(D-Arg和D-Lys),得到了改造体抗菌肽。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种改造体抗菌肽,所述改造体抗菌肽是通过将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示抗菌肽进行改造得到,所述的改造包括将氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示抗菌肽N末端的8个氨基酸剪切去除。

[0007] 其中,SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列为:

[0008] Arg¹ Arg² Ser³ Arg⁴ Phe⁵ Gly⁶ Arg⁷ Phe⁸ Phe⁹ Lys¹⁰ Lys¹¹Val¹²Arg¹³ Lys¹⁴Gln¹⁵ Leu¹⁶ Gly¹⁷ Arg¹⁸ Val¹⁹ Leu²⁰ Arg²¹ His²² Ser²³ Arg²⁴ Ile²⁵ Thr²⁶ Val²⁷ Gly²⁸Gly²⁹Arg³⁰Met³¹ Arg³²Phe³³。

[0009] 进一步地,所述改造体抗菌肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,具体序列为:

[0010] Phe¹ Lys² Lys³ Val⁴ Arg⁵ Lys⁶ Gln⁷ Leu⁸ Gly⁹ Arg¹⁰ Val¹¹ Leu¹² Arg¹³ His¹⁴ Ser¹⁵Arg¹⁶Ile¹⁷Thr¹⁸Val¹⁹Gly²⁰Gly²¹Arg²²Met²³Arg²⁴Phe²⁵。

[0011] 进一步地,所述的改造还包括将SEQ ID NO.2所示氨基酸序列中的精氨酸Arg替换成非天然的D型氨基酸D-Arg,将赖氨酸Lys替换成非天然的D型氨基酸D-Lys,其余均为天然L型氨基酸。

[0012] 进一步地,所述改造体抗菌肽的分子量为3026.67Da。

[0013] 进一步地,上述改造体抗菌肽的制备方法包括以下步骤:根据上述改造体抗菌肽的氨基酸序列,采用多肽固相合成法进行化学合成,得到全序列,再利用HPLC反相柱层析脱盐,得到该改造体抗菌肽。

[0014] 本发明的第二个目的是提供上述改造体抗菌肽在制备抗菌剂中的应用。

[0015] 进一步地,所述的抗菌剂用于抑制革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。

[0016] 进一步地,所述的革兰氏阳性细菌包括但不限于金黄色葡萄球菌(如金黄色葡萄球菌CMCC 26003、金黄色葡萄球菌ATCC 43300、金黄色葡萄球菌31、金黄色葡萄球菌08032706)、粪肠球菌(如ATCC 29212)、屎肠球菌、产气荚膜梭菌(如ATCC 13124)和表皮葡萄球菌等。

[0017] 进一步地,所述的革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌(如大肠杆菌ATCC 25922、大肠杆菌CMCC 44102)、铜绿假单胞菌(如铜绿假单胞菌CMCC 10104)、鲍曼不动杆菌(如鲍曼不动杆菌ATCC 19606、鲍曼不动杆菌2、鲍曼不动杆菌6、鲍曼不动杆菌16)、福氏志贺氏菌(如福氏志贺氏菌ATCC 12022)、鼠伤寒沙门氏菌(如鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028)、溶藻弧菌和哈维氏弧菌等。

[0018] 本发明的第三个目的是提供上述改造体抗菌肽在制备抗炎剂中的应用。

[0019] 进一步地,所述的抗炎剂用于抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)或白细胞介素6(IL-6)。

[0020] 本发明的第四个目的是提供上述改造体抗菌肽在制备抗生物膜药物中的应用。

[0021] 进一步地,所述的抗生物膜药物用于去除生物膜或抑制生物膜的形成。

[0022] 本发明的第五个目的是提供一种抗菌药物组合物,所述的抗菌药物组合物包括上述改造体抗菌肽和抗生素。

[0023] 进一步地,抗生素可为美罗培南、多粘菌素B、氨苄青霉素和万古霉素等。

[0024] 借由上述方案,本发明至少具有以下优点:

[0025] (1) 本发明通过对绿海龟抗菌肽Cm-CATH2进行两步改造,首先对绿海龟抗菌肽Cm-CATH2进行肽链缩短,然后在得到的最优抗菌肽的基础上,将其中的Arg和Lys替换成非天然的D型氨基酸(D-Arg和D-Lys),得到了进一步改造后的抗菌肽,其含有25个氨基酸残基,分子量3026.67Da,两者均具有广谱高效的抗菌活性和极强的抗炎活性。

[0026] (2) 本发明涉及的改造体抗菌肽比母本Cm-CATH2序列短分子量小,所以其合成成本更低、免疫原性更低,除此之外,该改造体抗菌肽还具有结构简单、溶血活性低、稳定性高、制备方法简单等有益特点,可应用于医药、化妆品、食品保鲜和养殖业等领域,极大地拓展了下游应用。

[0027] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合详细附图说明如后。

附图说明

[0028] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明。

[0029] 图1为改造体抗菌肽dNCM2和NCM4抗炎活性测定结果;

[0030] 图2为改造体抗菌肽dNCM2和NCM4蛋白酶稳定性测定结果;

[0031] 图3为改造体抗菌肽dNCM2和NCM4蛋白酶稳定性测试的峰面积变化图;

[0032] 图4为改造体抗菌肽dNCM2和NCM4对细菌生物膜的去活性;其中,A为A.baumannii ATCC19606,B为S.aureus CMCC26003;*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$,***代表 $P < 0.001$;

[0033] 图5为改造体抗菌肽dNCM2和NCM4对细菌生物膜形成的抑制作用;其中,A为A.baumannii ATCC19606,B为S.aureus CMCC26003;*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$,***代表 $P < 0.001$ 。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0035] 实施例1

[0036] 改造体抗菌肽dNCM2的化学合成

[0037] 绿海龟抗菌肽Cm-CATH2是基因编码的一种多肽,含有33个氨基酸残基,分子量4089.9Da,等电点12.96。绿海龟抗菌肽Cm-CATH2全序列为:Arg¹ Arg² Ser³ Arg⁴ Phe⁵ Gly⁶ Arg⁷ Phe⁸ Phe⁹ Lys¹⁰ Lys¹¹ Val¹² Arg¹³ Lys¹⁴ Gln¹⁵ Leu¹⁶ Gly¹⁷ Arg¹⁸ Val¹⁹ Leu²⁰ Arg²¹ His²² Ser²³ Arg²⁴ Ile²⁵ Thr²⁶ Val²⁷ Gly²⁸ Gly²⁹ Arg³⁰ Met³¹ Arg³² Phe³³。根据绿海龟抗菌肽Cm-CATH2的氨基酸序列,利用分子改造方法设计获得了改造体NCM4(全序列为:Phe¹ Lys² Lys³ Val⁴ Arg⁵ Lys⁶ Gln⁷ Leu⁸ Gly⁹ Arg¹⁰ Val¹¹ Leu¹² Arg¹³ His¹⁴ Ser¹⁵ Arg¹⁶ Ile¹⁷ Thr¹⁸ Val¹⁹ Gly²⁰ Gly²¹ Arg²² Met²³ Arg²⁴ Phe²⁵),然后进一步对NCM4进行氨基酸替换的结构改造,将其中的Arg和Lys替换成非天然的D型氨基酸(D-Arg和D-Lys),得到抗菌肽dNCM2,并利用多肽固相合成的方法对其进行了化学合成,具体制备方法如下:

[0038] (1) dNCM2的制备方法:根据上述dNCM2的氨基酸序列,用自动多肽合成仪(433A,

Applied Biosystems)合成其全序列,利用HPLC反相柱层析脱盐。

[0039] (2)分子量测定采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)。

[0040] (3)纯化的dNCM2用高效液相色谱HPLC方法鉴定其纯度。

[0041] 测定结果为:

[0042] dNCM2是绿海龟抗菌肽Cm-CATH2的一种改造体。dNCM2是一种直链多肽,含有25个氨基酸残基,分子量3026.67Da。dNCM2全序列为:Phe¹Lys² Lys³ Val⁴ Arg⁵ Lys⁶ Gln⁷ Leu⁸ Gly⁹ Arg¹⁰ Val¹¹ Leu¹² Arg¹³ His¹⁴ Ser¹⁵Arg¹⁶ Ile¹⁷ Thr¹⁸ Val¹⁹ Gly²⁰ Gly²¹ Arg²² Met²³ Arg²⁴Phe²⁵,其中所有赖氨酸和精氨酸为非天然D型氨基酸,其余均为天然L型氨基酸。

[0043] 实施例2

[0044] 改造体抗菌肽dNCM2和NCM4的药理实验:

[0045] 1.改造体抗菌肽dNCM2和NCM4抗菌活性测定:

[0046] (1)分别挑取保存于斜面上的试验菌株均匀涂布于MH固体培养基(北京索莱宝科技有限公司)平板上,将经过灭菌的0.5cm直径的滤纸片置于培养基表面,滴加溶解于灭菌去离子水的2mg/ml的抗菌肽dNCM2、NCM4或Cm-CATH2样品溶液10μl,于37℃倒置培养18-20小时,观察抑菌圈形成与否。若样品具有抗菌活性,则会在滤纸片周围形成清晰透明的抑菌圈,抑菌圈越大表明样品抗菌活性越强。

[0047] (2)改造体抗菌肽dNCM2和NCM4最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration)测定(2倍稀释法):

[0048] 选择上步实验中具有抑菌圈的菌株进行MIC测定实验。试验菌株接种到MH液体培养基(北京索莱宝科技有限公司)中,37℃振荡培养到对数生长期,而后用新鲜MH液体培养基将培养至对数生长期的培养液稀释到 2×10^5 cfu/ml待用。

[0049] 在无菌96孔板各孔中预先加入100μl MH液体培养基,然后在第一孔中加入100μl用MH液体培养基稀释到一定浓度的经0.22μm孔滤膜过滤的的抗菌肽dNCM2、NCM4或Cm-CATH2样品溶液,混匀后取100μl加入第2孔,依次倍比稀释(参见表1),自第9孔吸出100μl弃去,第10孔系对照管。

[0050] 表1稀释方法

[0051]

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培养基(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
样品(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
										(弃去)

[0052] 将上述各管混匀后放置37℃缓慢振荡培养18小时,于600nm波长处测定光吸收。最小抑菌浓度为看不见细菌生长的最低样品浓度。

[0053] 表2改造体抗菌肽dNCM2和NCM4抗菌活性

试验菌株	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Cm-CATH2	NCM4	dNCM2
大肠杆菌 ATCC25922	4.69	2.34	18.75
大肠杆菌 CMCC44102	4.69	2.34	37.5
铜绿假单胞菌 CMCC10104	9.38	4.69	9.38
鲍曼不动杆菌 ATCC19606	9.38	4.69	18.75
鲍曼不动杆菌 2	9.38	2.34	18.75
鲍曼不动杆菌 6	9.38	2.34	9.38
鲍曼不动杆菌 16	9.38	4.69	18.75
[0054] 福氏志贺氏菌 ATCC12022	1.17	9.38	9.38
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	18.75	18.75	37.5
溶藻弧菌	18.75	37.5	9.38
哈维氏弧菌	>100	18.75	9.38
金黄色葡萄球菌 CMCC26003	4.69	2.34	37.5
金黄色葡萄球菌 ATCC43300	9.38	9.38	9.38
金黄色葡萄球菌 31	9.38	9.38	37.5
金黄色葡萄球菌 08032706	9.38	9.38	75
粪肠球菌 ATCC29212	37.5	<1.17	37.5
[0055] 屎肠球菌	2.34	18.75	75
产气荚膜梭菌 ATCC13124	18.75	18.75	18.75
表皮葡萄球菌	9.38	18.75	75

[0056] MIC:最小抑菌浓度,以上结果为三次独立重复实验平均值。

[0057] 由表2可见,未改造的抗菌肽Cm-CATH2和改造后的抗菌肽NCM4和dNCM2对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌均表现出极强的抗菌活性,其中包括部分临床分离致病菌,NCM4的受试细菌的MIC值 $\leq 18.75\mu\text{g/ml}$,dNCM2的受试细菌的MIC值处于9.38-75 $\mu\text{g/ml}$ 的范围。

[0058] 2.改造体抗菌肽dNCM2和NCM4溶血活性测定:

[0059] 将采集的兔血与阿氏液混合抗凝,生理盐水洗涤2次并重悬成 10^7-10^8cell/ml 的悬浮液。上述稀释好的红细胞悬液与溶解于生理盐水的dNCM2、NCM4或Cm-CATH2样品混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温30min,再于1000rpm离心5min,上清液于540nm测吸收值。阴性对照使用生理盐水,阳性对照使用Triton X-100,溶血百分比按以下公式计算:溶血百分比 $H\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}}{A_{\text{阳性对照}}} \times 100\%$ 。

[0060] 结果表明样品浓度为100 $\mu\text{g/ml}$,dNCM2的溶血百分比为1.29%,NCM4的溶血百分比为1.51%,而Cm-CATH2的溶血百分比为4.1%。说明dNCM2和NCM4均具有更低的溶血活性,不易引起哺乳动物红细胞破裂溶解。尤其抗菌活性范围内,安全性高。

[0061] 3.改造体抗菌肽dNCM2和NCM4抗炎活性测定:

[0062] 提取6-8周龄C57小鼠腹腔巨噬细胞,用含10%血清的1640培养基培养过夜,次日换成含2%血清的1640培养基,然后用终浓度为100ng/mL的大肠杆菌LPS(Sigma,美国)刺激细胞,同时给多肽dNCM2或NCM4,终浓度为20 $\mu\text{g/mL}$,设不给多肽和LPS的空白对照组与仅给

LPS的阳性对照组,共孵育16h,取上清,用ELISA试剂盒(R&D,美国)检测上清液中促炎因子IL-6和TNF- α 的含量。每个做三个平行。

[0063] 结果如图1所示,dNCM2能够显著抑制小鼠腹腔巨噬细胞中LPS诱导的促炎因子IL-6和TNF- α 表达,表明dNCM2具有极强的抗炎活性,且其抗炎活性与NCM4相当。

[0064] 4.改造体抗菌肽dNCM2和NCM4稳定性实验研究:

[0065] (1)酶稳定性测试:将细胞消化用的0.25%胰酶与多肽样品,按照摩尔比1:200的比例混合,37℃下孵育,分别在0、6、12、24h时取样50 μ L,然后用多肽溶剂将所取样品稀释1倍,用0.22 μ m的滤膜过滤,取20 μ L用反向高效液相色谱测定多肽样品的残留量。其中A相用含0.1%三氟乙酸(TFA)的纯水,B相用含0.1%TFA的乙腈,进行梯度洗脱,得到多肽样品dNCM2或NCM4与胰酶混合后不同时间点的洗脱峰和积分面积,然后用软件Origin2018作图。

[0066] 结果如图2和3所示,抗菌肽dNCM2具有很强的酶稳定性,与酶作用24h后dNCM2的峰高和峰面积仍然变化不大,而抗菌肽NCM4和Cm-CATH2 6h就显著降解,说明dNCM2的酶稳定性显著优于NCM4和Cm-CATH2。

[0067] (2)盐耐受性、热耐受性和热稳定性测试

[0068] 盐耐受性:大肠杆菌ATCC25922用MH液体培养基(青岛海博生物技术有限公司)于37℃培养12小时,然后分别用含0、50、100、150、200和400mM氯化钠的新鲜MH液体培养基稀释到 10^6 CFU/ml。用含相应氯化钠浓度的MH液体培养基制备不同浓度梯度的dNCM2、NCM4和Cm-CATH2样品。利用2倍稀释法测定dNCM2、NCM4和Cm-CATH2对大肠杆菌ATCC25922的MIC值,以此确定氯化钠对dNCM2、NCM4和Cm-CATH2抗菌活性的影响。

[0069] 热耐受性:dNCM2、NCM4或Cm-CATH2溶解于灭菌的去离子水中(2mg/ml),在4、20、37、50、70和90℃孵育1小时,然后利用2倍稀释法测定样品对大肠杆菌ATCC25922的MIC值,以此确定不同温度加热对样品抗菌活性的影响。

[0070] 热稳定性:dNCM2、NCM4或Cm-CATH2溶解于灭菌的去离子水中(2mg/ml),在37℃孵育0-96小时。于0、6、12、24、48、72和96小时分别取样品检测对大肠杆菌ATCC25922的MIC值,以此确定样品的热稳定性。

[0071] 如表3所示,dNCM2、NCM4和Cm-CATH2具有很强的盐耐受性。在低于或等于人体生理盐浓度下(≤ 150 mM NaCl),dNCM2、NCM4和Cm-CATH2的抗菌活性保持不变。在盐浓度高于人体生理盐浓度后,dNCM2和NCM4的抗菌活性也只是随着盐浓度的升高而略有降低,尤其是dNCM2,在200mM NaCl的条件下,抗菌活性也保持不变。

[0072] 表3改造体抗菌肽dNCM2和NCM4盐耐受性

NaCl 浓度 (mM)	MIC (μ g/ml)		
	Cm-CATH2	NCM4	dNCM2
0	4.69	2.34	18.75
50	4.69	2.34	18.75
100	4.69	2.34	18.75
150	4.69	2.34	18.75
200	9.38	4.69	18.75
400	9.38	4.69	37.5

[0073] 如表4所示,dNCM2具有很强的热耐受性。dNCM2溶液在90℃放置1小时之后,其抗菌

活性不会改变。与之相比,NCM4和Cm-CATH2的热耐受性略差,在高温下加热1h后,其MIC值均有升高。

[0075] 表4改造体抗菌肽dNCM2和NCM4热耐受性

处理温度 (° C)	MIC (µg/ml)		
	Cm-CATH2	NCM4	dNCM2
4	4.69	2.34	18.75
20	4.69	2.34	18.75
37	4.69	2.34	18.75
50	9.38	2.34	18.75
70	9.38	4.69	18.75
90	18.75	4.69	18.75

[0077] 许多传统的抗生素,如头孢类抗生素的溶液极不稳定,几个小时内就会失去活性,这大大限制了它们的使用。与之不同,dNCM2溶液具有很好的热稳定性。dNCM2溶液在37°C放置96小时后,其抗菌活性不会改变(如表5)。与之相比,NCM4和Cm-CATH2的热稳定性略差,在37°C放置96小时后,其MIC值均有升高。

[0078] 表5改造体抗菌肽dNCM2热稳定性

放置时间 (h)	MIC (µg/ml)		
	Cm-CATH2	NCM4	dNCM2
0	4.69	2.34	18.75
6	4.69	2.34	18.75
12	4.69	2.34	18.75
24	9.38	2.34	18.75
48	9.38	4.69	18.75
72	18.75	4.69	18.75
96	18.75	9.38	18.75

[0080] 实施例3

[0081] 改造体抗菌肽dNCM2和NCM4的生物膜清除和抑制活性测

[0082] 1. 生物膜清除活性测定

[0083] 从-80°C冰箱中取出保存的菌株,37°C水浴快速融化,用接种环蘸取少许液体,在LB固体培养基上呈Z字形分四个区域划线,每次划线从上次末端开始,37°C恒温培养至长出单菌落;挑取单菌落于无菌液体MHB培养基中,37°C、180rpm振荡培养至对数生长期;检测菌液浓度,稀释成 2×10^7 CFU/mL。向无菌96孔板中加入上述菌液200µL,37°C培养48h使生物膜形成。吸出每孔的菌液,并用PBS洗涤三次。每孔加入200µL稀释后的多肽样品使多肽样品终浓度为 $0.5 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 和 $8 \times \text{MIC}$,37°C恒温培养24h。每孔加入结晶紫染液(0.1%),染色30min后吸出染液,无菌PBS洗涤三次,超净台中风干。每孔加入100µL无水乙醇,静置20min,溶解结晶紫。在紫外波长560nm下检测OD值,实验设置三个平行。用以下公式计算生物膜形成的百分比(Biofilm Retention%,BR%): $\text{BR}(\%) = 100\% - [100\% \times (F_0 - F_{\text{peptide}}) / F_0]$,该实验中选择PBS作为阴性对照,其测定值视为最大生物膜残留量。Biofilm Retention%,BR%为生物膜残存百分比, F_0 为PBS处理组的吸光值, F_{peptide} 为多肽处理组吸

光值。

[0084] 2. 生物膜抑制活性测定

[0085] 从-80℃冰箱中取出保存的菌株,37℃水浴快速融化,蘸取少许液体在LB固体培养基上呈Z字形划线,在37℃恒温培养至长出单菌落;挑取单菌落于无菌液体MHB培养基中,37℃,180rpm振荡培养至对数生长期;检测菌液浓度,稀释成 2×10^7 CFU/mL。向无菌96孔板中加入上述菌液190μL,每孔加入稀释后的多肽样品,每个浓度设置3个平行。使得多肽样品终浓度为 $0.5 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 和 $8 \times \text{MIC}$,37℃恒温培养48h。吸出每孔的菌液,并用PBS洗涤三次,把板置于超净台通风吹干。每孔加入结晶紫染液(0.1%),染色30min后吸出染液,无菌PBS洗涤三次,超净台中风干。每孔加入100μL无水乙醇,静置20min,溶解结晶紫。在紫外波长560nm下检测OD值。用以下公式计算生物膜形成的百分比(Biofilm Formation%,BF%): $\text{BF}(\%) = 100\% - [100\% \times (F_0 - F_{\text{peptide}}) / F_0]$ 其中PBS(F_0)为阴性对照,其测定值视为最大生物膜形成量。Biofilm Formation%,BF%为生物膜形成百分比, F_{peptide} 为多肽处理组吸光值。

[0086] 如图4和5所示,改造体多肽dNCM2和NCM4都能有效清除鲍曼不动杆菌(图4A)和金黄色葡萄球菌(图4B)产生的生物膜,且存在浓度依赖,且dNCM2在清除鲍曼不动杆菌产生的生物膜时表现比NCM4更优。改造体多肽dNCM2和NCM4均能在高浓度下抑制鲍曼不动杆菌(图5A)和金黄色葡萄球菌(图5B)产生生物膜。而较NCM4能更好地抑制金黄色葡萄球菌产生生物膜而言,dNCM2能更好地抑制鲍曼不动杆菌产生生物膜。

[0087] 实施例4

[0088] 改造体抗菌肽dNCM2和NCM4与抗生素协同抗菌作用测定

[0089] 将多肽用无菌水配成 $20 \times 8\text{MIC}$ 的浓度,依次再倍比稀释直到 $20 \times 1/64\text{MIC}$,加上溶剂共11个浓度备用。称取抗生素(美罗培南、多粘菌素B、氨苄青霉素和万古霉素)药品,用无菌水溶成2mg/mL的溶液,依次倍比稀释得到4MIC-1/16MIC的浓度,加上溶剂共8个浓度备用。稀释菌液至 5×10^5 CFU/mL,备用。

[0090] 棋盘法测:在96孔板中加入90μL稀释好的菌液;将多肽加到菌中,每孔5μL,每一列一个浓度,共11列;将抗生素加到菌中,每孔5μL,每一行一个浓度,共8行;找到MICA,MICB,A,B计算FIC, $\text{FIC} = \text{FMICA} + \text{FMICB} = \text{A}/\text{MICA} + \text{B}/\text{MICB}$ (A,B代表两药联用的最佳集合点处的浓度,MICA,MICB代表两药单用时的MIC), $\text{FIC} < 0.5$ 时有协同作用, $\text{FIC} > 4$ 时有拮抗作用, $0.5 < \text{FIC} < 4$ 时两药有相加作用。加药方式如下表所示。

[0091]

	Peptide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Antibiotic		8×	4×	2×	MIC	1/2	1/4	1/8	1/6	1/3	1/4	0
A	4×											
B	2×											
C	MIC											
D	1/2											
E	1/4											
F	1/8											
G	1/16											
H	0											
$\text{FICI} = \text{FMICA} + \text{FMICB} = \text{A}/\text{MICA} + \text{B}/\text{MICB}$												

[0092] 选用鲍曼不动杆菌 (*A.baumannii* ATCC19606) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*S.aureus* ATCC43300) 作为供试菌, 检测了几种抗生素与改造体抗菌肽 dNCM2 的协同抗菌作用。其中美罗培南和多粘菌素 B 均能与之协同发挥抗鲍曼不动杆菌的作用, FICI 指数分别为 0.25 和 0.375。而氨苄青霉素和万古霉素能与改造体抗菌肽 dNCM2 协同抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用, FICI 指数分别为 0.375 和 0.1875。

[0093] 显然, 上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例, 并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说, 在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

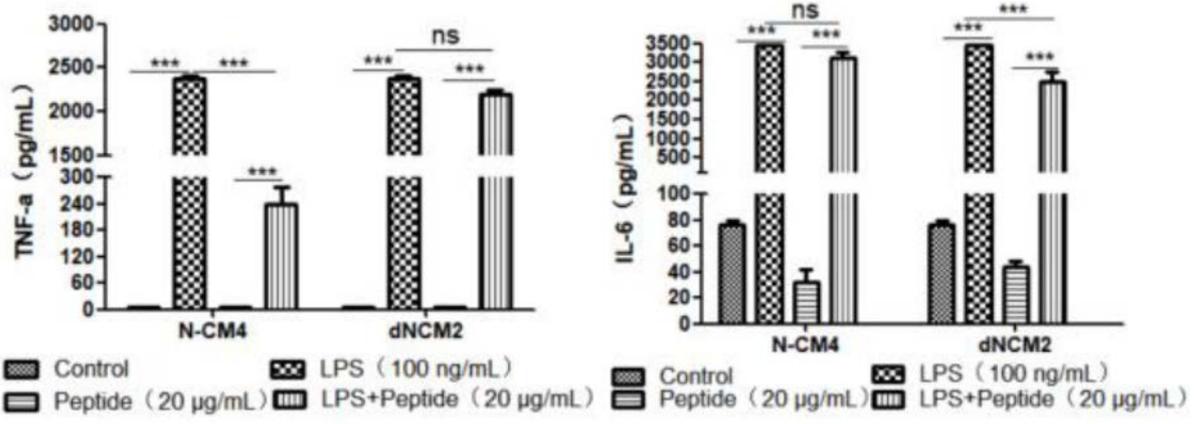


图1

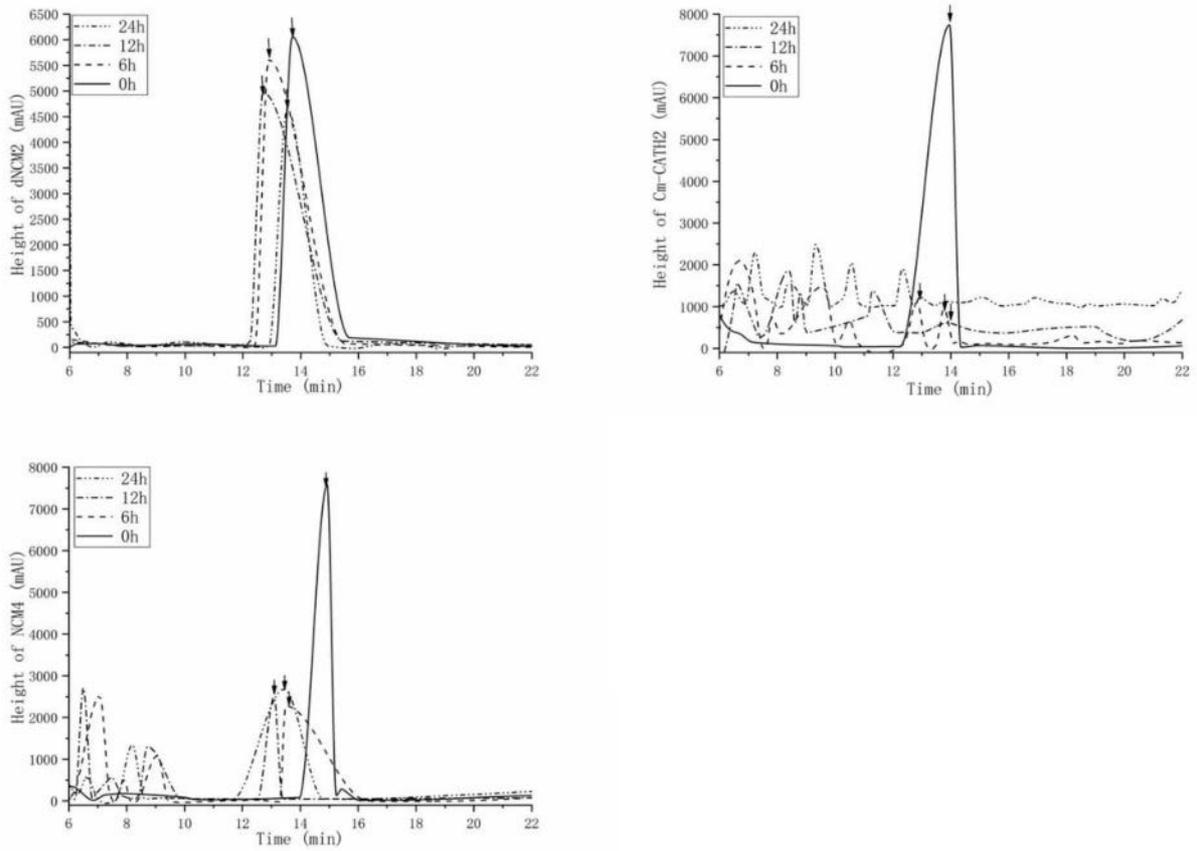


图2

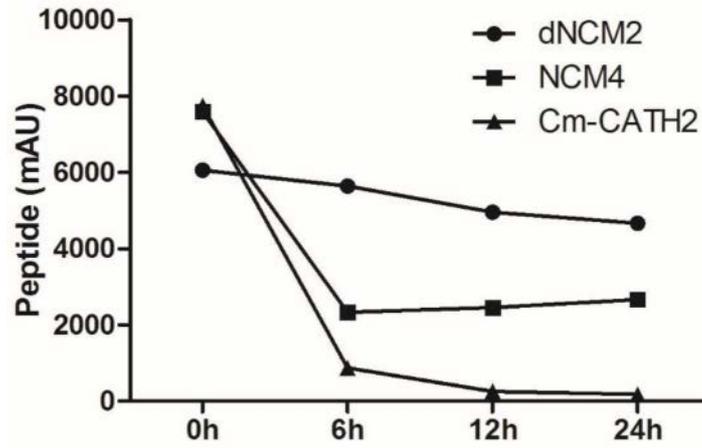


图3

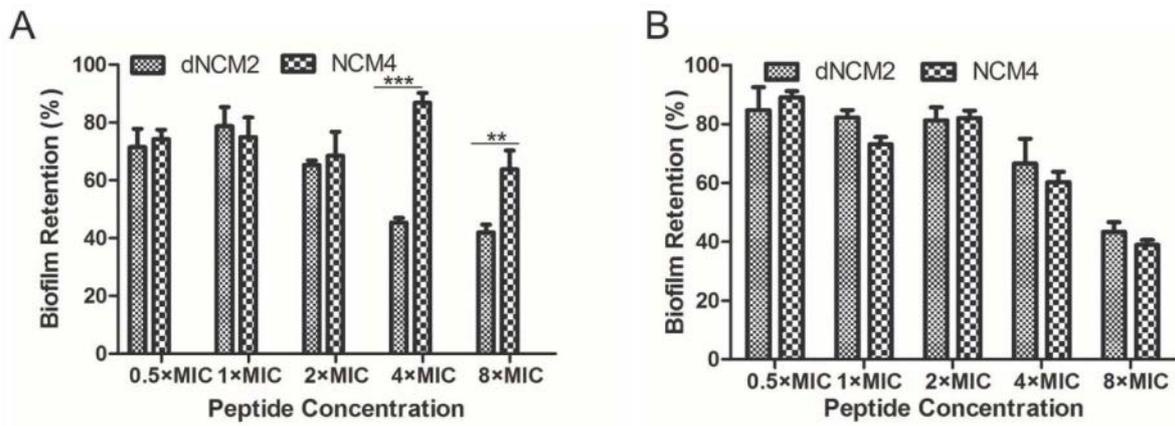


图4

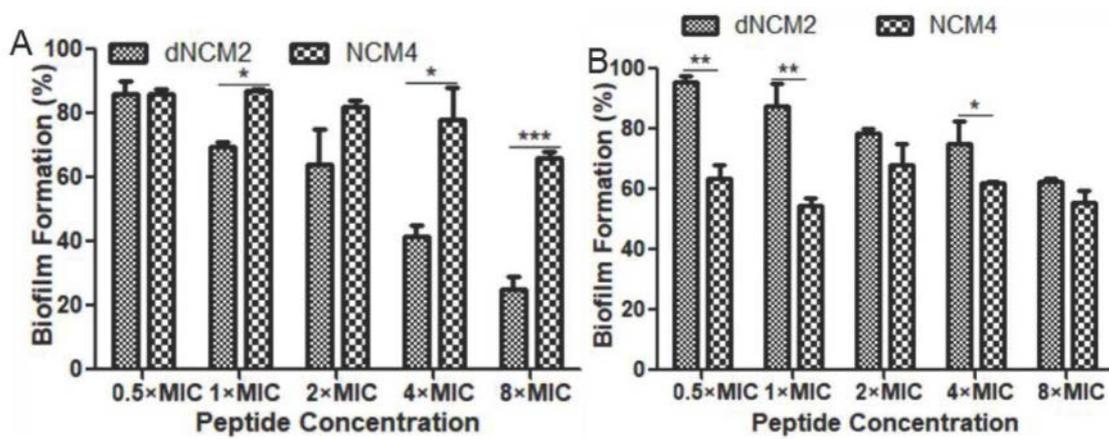


图5