

柞蚕抗菌肽的分离纯化及杀菌效应

邓小娟, 黄自然

(华南农业大学艺术设计学院蚕丝科学系, 广东 广州 510642)

摘要: 大肠杆菌(*E. coli* K₁₂D₃₁)诱导的柞蚕(*Antheraea pernyi*)蛹血淋巴, 经加热处理后, 进行 CM- Sepharose 阳离子交换层析, FPLC Pep RPC 反相柱及 HPLC Hi-Pore C₁₈反相柱层析, 纯化得到一类抗菌肽. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定其相对分子质量约为 2 400. 氨基酸组成分析表明其富含赖氨酸、丙氨酸和甘氨酸, 摩尔分数分别为 18.6%、15.5%和 13.6%, 不含甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸和组氨酸. 抗菌谱表明该肽对多种革兰氏阴性和阳性细菌均有抑制作用.

关键词: 柞蚕; 抗菌肽; 纯化; 杀菌效应

中图分类号: S885.1

文献标识码: A

自抗菌肽首先从惜古比天蚕(*Hyatophora cecropia*)蛹中分离得到以来, 在其他昆虫, 如烟草原天蛾、家蚕、柞蚕、麻蝇和果蝇中也相继分离并测序. 研究表明昆虫受细菌感染或创伤时体内通常产生多种抗菌物质. 这些抗菌物质的抗菌谱往往存在一定的差异, 它们组成一个网络系统, 共同参与免疫反应. 为揭示各种抗菌物质在防御系统中的作用, 有必要对它们进行纯化鉴定.

前人^[1,2]报道, 大肠杆菌诱导的柞蚕抗菌肽以抗菌肽 D 为主. 本文从柞蚕蛹免疫血淋巴中分离到一类抗菌肽, 该抗菌肽的色谱行为和氨基酸组成与曾报道的柞蚕抗菌肽有很大差异, 可能是一类新型的抗菌肽.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

柞蚕品种: 三三、青黄, 由河南省云阳蚕业试验场提供.

大肠杆菌(*Escherichia coli* K₁₂D₃₁)由瑞典 Boman 教授提供. 金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由广东药学院赠送, 肉汤培养基 35℃培养.

蛋白质常规层析系统、快速蛋白液相层析(FPLC)系统、CM- Sepharose FF 离子交换凝胶、FPLC Pep RPC 柱(Pharmacia); 高效液相色谱系统、HPLC Hi-Pore C₁₈柱、蛋白质电泳装置(Bio-Rad); 氨基酸组成分析仪(Beckman 121MB).

N-(三羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine, Sigma); 乙腈(色谱纯, 国产); 三氟乙酸(Sigma); 蛋白质相对分

子质量标准(Promega).

1.2 试验方法

1.2.1 柞蚕蛹的诱导和免疫血淋巴的收集 参照 Qu 等^[1]和戴祝英等^[3]的方法进行.

1.2.2 抗菌肽的分离纯化 收集的免疫血淋巴经沸水浴处理 20 min, 迅速置冰浴冷却. 4℃, 12 000 r/min 离心, 上清液经 0.45 μm 硝酸纤维素滤膜过滤后进行柱层析.

先进行阳离子交换柱层析: CM- Sepharose FF (1.6 cm×15.0 cm)经 0.05 mol/L NH₄Ac(pH 5.1)平衡, 上样, 以同一缓冲液洗至记录仪基线走平. 进行阶段洗脱[0.05~0.4 mol/L NH₄Ac(pH 5.1)和 0.4~1.0 mol/L NH₄Ac(pH 5.1)], 流速为 1 mL/min, 自动收集器(FRAC-300)收集, 4 min/管. 合并收集的抗菌活性部分, 加三氟乙酸(TFA)使终浓度 φ 为 0.1%, 上 FPLC Pep RPC 反相柱(5 mm×50 mm), 进行阶段洗脱(φ 为 0~20% 乙腈, 含 φ 为 0.1% TFA 和 φ 为 20%~50% 乙腈, 含 φ 为 0.1% TFA), 流速 0.5 mL/min, 收集活性峰. 上 HPLC 反相柱进一步纯化, 选用 Hi-Pore RP-318 C₁₈柱(Bio-Rad, 4.6 mm×250 mm), 注入样品 100 μL, 同样用水-三氟乙酸-乙腈系统为流动相, 以含 φ 为 0.1% 三氟乙酸的 15%~50%(φ)乙腈作线性洗脱, 流速为 1 mL/min, 280 nm 紫外检测, 收集活性峰. 冷冻干燥后即得抗菌肽纯品, 于-20℃保存.

1.2.3 杀菌活性和杀菌效价的测定 参照 Hultmark^[4]的方法.

1.2.4 最低抑制浓度(MIC)的测定 抗菌肽水溶液

作 2 倍系列稀释, 按琼脂板孔穴扩散法测定杀菌活性, 以产生肉眼可见的抑菌圈时的最小浓度为最低抑制浓度。

1.2.5 蛋白质电泳 参照 Schagger 等^[3] 的方法, 进行 Tricine-SDS-PAGE, 分离胶质量分数为 16.5%, 采用考马斯亮蓝染色。

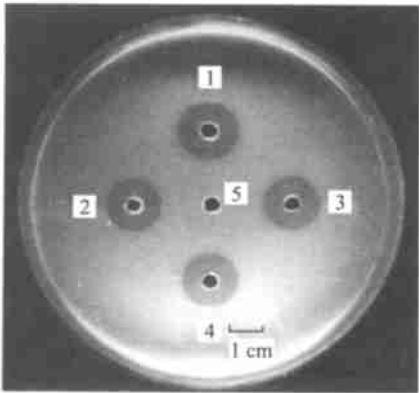
1.2.6 生物自显影鉴定抗菌成分 参照 Vigers^[6] 生物自显影的方法。Tricine-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 在凝胶的两侧平行上样。电泳结束后, 将凝胶的一半用于活性测定, 另一半用于考马斯亮蓝染色。根据抑菌斑的位置确定活性成分在凝胶上的对应区带。

1.2.7 氨基酸组成分析 以 6 mol/L 盐酸于 110 °C 水解 24 h, 在 Beckman 121 MB 氨基酸分析仪上进行分析。

2 结果与分析

2.1 柞蚕蛹免疫血淋巴的抗菌活性

LB 固体培养基加热溶化, 冷却至 65 °C 左右, 加入大肠杆菌 K12D31 1×10⁶ 个/mL, 摇匀后倒板。待培养基完全凝固后在平板上打孔, 孔的直径为 5 mm。将待测样品 30 μL 加入孔中, 培养过夜, 观察抑菌结果。可见柞蚕蛹免疫血淋巴的周围产生明显的抑菌圈, 抑菌圈直径为 15 mm(图 1)。



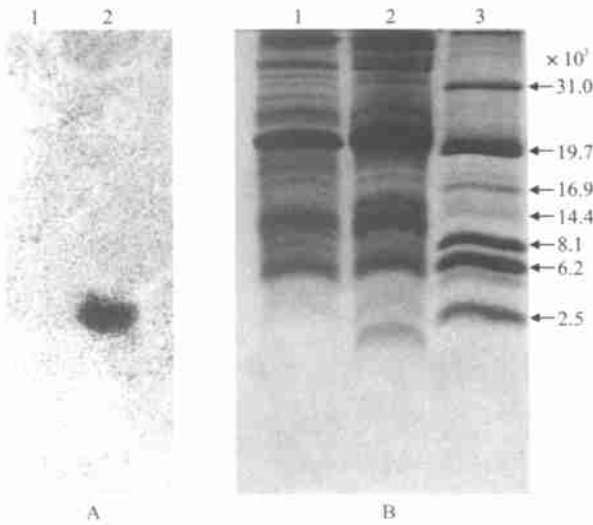
1~4 免疫血淋巴孔穴 immunized hemolymph of *A. pernyi*;
5. 正常血淋巴 normal hemolymph of *A. pernyi*

图 1 免疫血淋巴对 *E. coli* K12D31 的抑菌作用

Fig. 1 Antibacterial action of immunized hemolymph to *E. coli* K12D31

2.2 柞蚕蛹免疫血淋巴的抗菌组分

生物自显影结果表明: 柞蚕蛹免疫血淋巴的主要抗菌组分为一相对分子质量约 2 400 的多肽(图 2)。



1 正常柞蚕蛹血淋巴 normal hemolymph, 2 免疫柞蚕蛹血淋巴 immunized hemolymph, 3. 蛋白质相对分子质量标准 protein molecule marker A. Tricine-SDS-PAGE 生物自显影 bioautography B. Tricine-SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色 visualization with coomassie brilliant blue stain

图 2 柞蚕蛹免疫血淋巴中抗菌活性组分生物自显影图

Fig. 2 Bioautography of antibacterial factors of *A. pernyi*

2.3 抗菌肽的分离纯化

抗菌肽的热稳定好, 免疫血淋巴经加热处理可使大量的大分子蛋白变性, 达到初步纯化的目的。加热处理后得到的上清, 进行阳离子交换层析, 层析图谱见图 3。合并活性组分, 在 FPLC 系统上以 Pep RP 柱反相层析进一步纯化(图 4)。电泳显示: 该活力部分呈一单带(图 5), 说明质荷比已达到均一。但在 HPLC Hi-Pore 仍有分离, 见图 6。

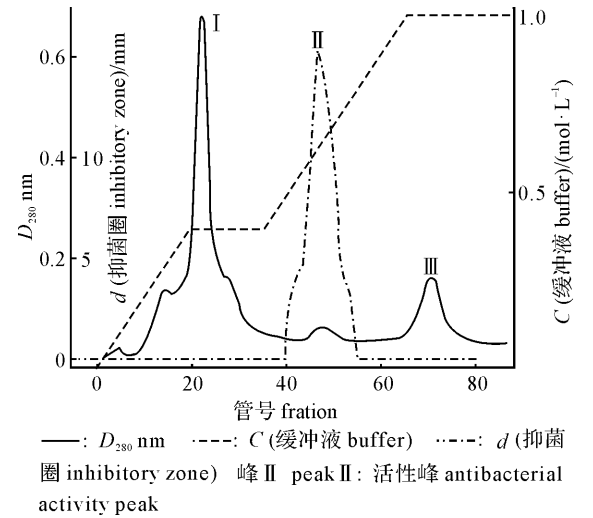
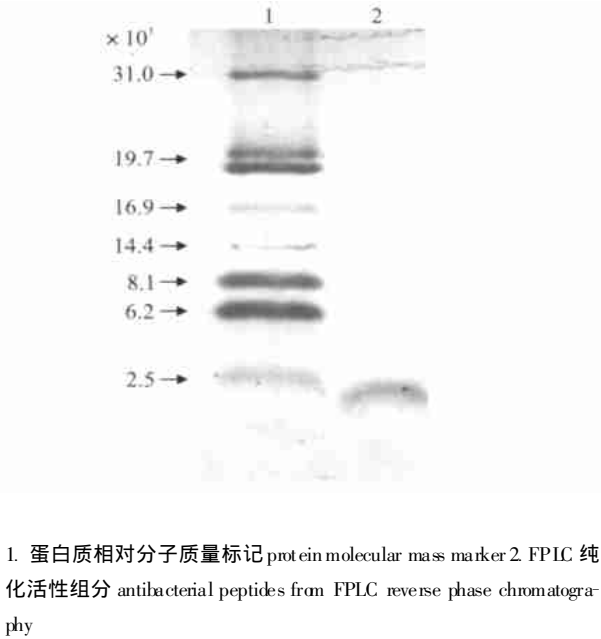
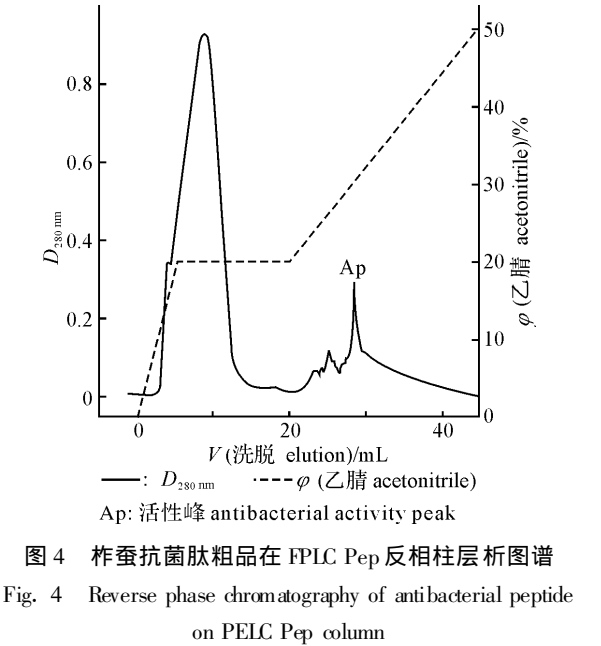


图 3 柞蚕免疫血淋巴的 CM-Sephacel FF 柱层析图谱

Fig. 3 Ion exchange chromatography of immunized hemolymph on CM-Sephacel fast flow column



2.4 抗菌肽的性质

2.4.1 最低抑制浓度 抗菌肽水溶液0.26 g/L的2倍系列稀释液,对 *E. coli* K12D31能产生抑菌圈的最大稀释倍数为2⁵,可见该肽对 *E. coli* K12D31的最低抑制浓度为8.1 mg/L.

2.4.2 氨基酸组成 该抗菌肽富含赖氨酸、丙氨酸和甘氨酸,摩尔分数分别为18.6%、15.5%、13.6%,而缺乏甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸和组氨酸.与柞蚕抗菌肽 cecropin D^[1] 和家蚕抗菌肽 moricin^[7] 的氨基酸组成相比,本文得到的抗菌肽与 moricin 相似,为一类富含赖氨酸的多肽,而 cecropin D 富含丙氨酸,摩

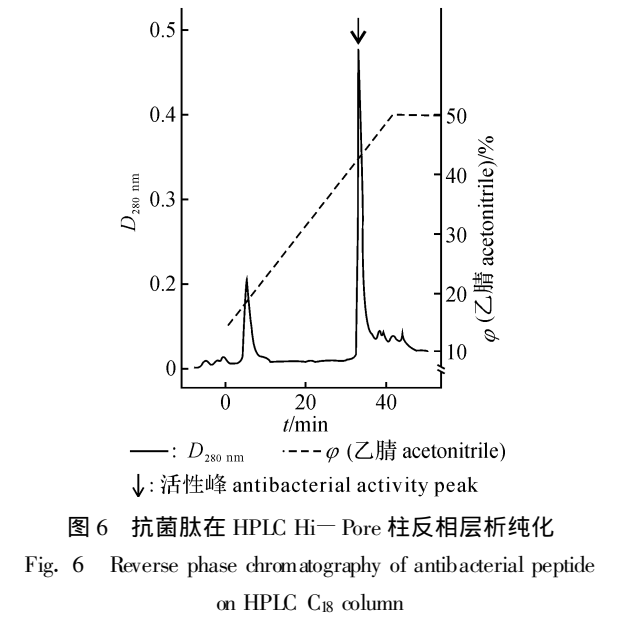


表 1 抗菌肽的氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid composition of the antibacterial peptide

氨基酸种类	摩尔分数	氨基酸种类	摩尔分数
amino acids	(x)/%	amino acids	(x)/%
Asp ¹⁾	8.01	Met	0
Thr	2.07	Ile	8.04
Ser	2.28	Leu	3.96
Glu ¹⁾	8.91	Tyr	0
Pro	3.90	Phe	3.09
Gly	13.64	Lys	18.58
Ala	15.48	His	0
Cys	0	Arg	4.74
Val	7.29	Trp ²⁾	

1) 包括相应的酰胺; 2) 未进行碱水解测定

尔分数达25.0%,赖氨酸的摩尔分数仅为5.5%.

2.4.3 抗菌谱 以黄瓜角斑病菌、水稻白叶枯病菌等动植物病原细菌为对象,试验抗菌肽的抗菌谱.结果表明,抗菌肽对大肠杆菌 (*Escherichia coli* K12D31)、黄瓜角斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)、马铃薯青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum* Smith)、胡萝卜软腐病菌 (*Erwinia carotora* var. *carotovora* Dya)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach) 有明显的抑菌活性,未检测出对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)、水稻条斑病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* Conn.) 的抑菌活性.

3 讨论

以大肠杆菌免疫柞蚕蛹时,诱导产生的抗菌物质以抗菌肽D为主.本文曾尝试按Qu Xian-ming报道的方法来纯化抗菌肽,试验未成功.原因是经CM

—Sephrose FF 得到的活性组分在 Phenyl—Sephrose CL—4B 疏水柱上不能吸附, 推测该活性组分不同于曾报道的抗菌肽, 可能分子结构上的差异或个别氨基酸的减少、替换影响了它的疏水性. 氨基酸组成上的差异证实了这一点. 为阐明该抗菌肽的一级结构, 有待于进行氨基酸序列的测定.

抗菌肽具有广谱的杀菌特性, 对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抑制作用. 本文纯化得到的抗菌肽, 在试验的菌株中, 对大肠杆菌最为敏感, 对黄瓜角斑病菌、金黄葡萄球菌、马铃薯青枯病菌和胡萝卜软腐病菌也有抑菌作用. 可望利用基因工程的方法培育抗病品种, 事实上在这方面已有不少成功的报道. 尤其值得一提的是, 本文纯化得到的抗菌肽对耐药性金黄葡萄球菌具有杀菌作用. 由于抗生素的广泛应用, 导致耐药性的菌株不断出现和抗性的增加, 国内外正致力于开发抗菌肽在医药上的应用研究.

致谢: 本论文在北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室完成, 衷心感谢陈章良教授和徐庆博士提供实验条件并给予悉心指导.

参考文献:

[1] QU X M, STEINER H, ENGSTROM A, et al. Insect immu-

nity: Isolation and structure of cecropin B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi* [J]. Eur J Biochem, 1982, 127: 219—224.

[2] 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 不同诱导源对柞蚕血淋巴及生殖腺中抗菌物质产物的影响[J]. 生物化学杂志, 1985, 19(4): 49—56.

[3] 戴祝英, 张双全. 大肠杆菌诱导家蚕蛹免疫血淋巴中抗菌物质的分离、纯化与鉴定[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 1988, 1: 88—92.

[4] HULTMARK D, STEINER H R, RASMUSON T, et al. Insect immunity: purification and properties of the inducible bacterial proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7—16.

[5] SCHAGGER H, JAGOW G V. Tricine—sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa [J]. Anal Biochem, 1987, 166: 368—379.

[6] VIGERS A J, ROBERTS W, SELITRENNIKOFF C P. A new family of plant antifungal proteins [J]. Molecular Plant Microbe Interaction, 1991, 4(4): 315—323.

[7] HARA S, YAMAKAWA M. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Biochem J, 1995, 310: 651—655.

Isolation and Purification of Antibacterial Peptide from Chinese Oak Silkworm, *Antheraea pernyi* and Its Bactericidal Effects

DENG Xiao-juan, HUANG Zi-ran

(Dept. of Seri. Sci., College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Injection of live nonpathogenic bacteria, *Escherichia coli* K₁₂D₃₁ into pupae of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*, induced antibacterial peptides in the hemolymph. The major antibacterial peptide was purified with CM—Sephrose cation—exchange chromatography, reverse phase chromatography on FPLC system and C₁₈ column reverse phase chromatography on HPLC system. The purified peptide had a molecular mass of about 2 400 as determined by SDS—PAGE and its amino acid composition was shown to be rich in lysine, alanine and glycine, while lacking in methionine, cysteine, tyrosine and histidine. The molar content of lysine, alanine and glycine was 18.6%, 15.5%, 13.6% respectively. Inhibitory spectrum showed that it was potent against several Gram—negative and Gram—positive bacteria.

Key words: Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*); antibacterial peptide; purification; antibacterial effects

【责任编辑 周志红】