

重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中 常见病原菌的抑菌效果

姜 兰¹, 白俊杰¹, 邓国成¹, 黄自然²

(1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 华南农业大学 蚕桑系, 广东 广州 510640)

摘 要:采用 YEPD 培养基诱导发酵生产重组抗菌肽。经 72 h 培养, 由重组酵母表达并分泌到培养基中的抗菌肽活性可高达 5 000 U/ml。用滤纸片扩散法和试管稀释法测定重组抗菌肽对水产养殖常见病原菌的抑菌效果。结果表明, 抗菌肽对水产养殖常见病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovi*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)及温和气单胞菌(*A. sobria*)有较好的抑菌效果, 最小抑菌质量浓度为 4 $\mu\text{g/ml}$ 、杀菌质量浓度为 8 $\mu\text{g/ml}$ 。对抗菌肽抑菌过程的超微结构观察表明, 抗菌肽的抑菌方式是通过作用于细菌的细胞膜而导致菌体裂解死亡。本研究目的在于探讨基因工程抗菌肽在水产养殖中的应用。

关键词:重组抗菌肽; 抑菌效果; 嗜水气单胞菌; 梅氏弧菌; 迟钝爱德华氏菌; 温和气单胞菌

中图分类号:S948

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)02-0152-05

抗菌肽(Antimicrobial peptides)最早是从昆虫血淋巴中分离的一类生物活性肽, 由 30~40 个氨基酸组成, 是昆虫免疫体系的重要组成部分。国内外研究发现, 抗菌肽或类似抗菌肽的小分子肽类广泛存在于生物界^[1]。这类活性肽具两亲性 2 级结构, 能选择性地作用于细菌外层细胞膜的某些组分, 破坏膜的稳定性并产生穿孔现象, 从而增大其渗透性以杀死或抑制细菌的生长^[2]。研究表明, 抗菌肽具有高效广谱的抗菌活性, 目前已知对 100 多种细菌有杀伤作用, 对某些真菌、原生动物、病毒, 尤其对耐药性细菌也有杀灭或抑制作用^[3~5]。

抗菌肽也是鱼、虾、贝等水生动物抗病毒防御系统的主要成分之一。国外在抗菌肽对鳃弧菌、杀鲑弧菌及杀鲑气单胞菌等的抑菌作用方面做过报道^[7], 并证实罗氏沼虾、南美白对虾及海水鱼中均发现有抗菌肽类物质存在^[8]。国内有关抗菌肽

对水产养殖病害的防治研究尚未见报道。本文就基因工程抗菌肽的制备及其对 4 种水产养殖中常见病原菌的抑菌效果进行探讨, 为基因工程抗菌肽在水产养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

昆虫抗菌肽基因工程酵母菌^[9]及测定抗菌肽活性的大肠杆菌(*E. coli* K-12), 由华南农业大学蚕桑系黄自然教授实验室提供。

水产病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovi*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)由珠江水产研究所鱼病室保存。

YEPD 培养基、营养琼脂及营养肉汤培养基按常规方法配制。

1.2 重组抗菌肽的制备

1.2.1 基因工程酵母的发酵 50 L 发酵罐、YEPD 完全培养基发酵培养工程菌, 条件为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0~6.5、搅拌速度 500 r/min、供气量 25~40 L/min。培养 36 h 后加入适量甲醇诱导, 连续培养至 72 h,

收稿日期: 2001-08-14。

项目基金: 农业部“九五”重点渔业科技项目(95-B-96-02-08-02)。

作者简介: 姜 兰(1965-), 女, 副研究员, 主要从事鱼类病害研究工作。E-mail: jianglan2@163.net

离心取上清备用。

1.2.2 重组抗菌肽的纯化 收获的发酵液上清, pH 4.2、100 ℃ 水浴 10 min, 冰浴冷却后 1 200 r/min 离心 15 min, 取上清用 NaOH 调 pH 至 5.2; 用 CM-Sephrose FF 柱进行柱层析分离^[10], 0.05~1 mol/L 乙酸铵缓冲液(pH 5.2)梯度洗脱, 收集合并活性峰组分, 用紫外分光光度计测定蛋白含量, 置 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.3 重组抗菌肽的杀菌效价测定 参照 Hultmark^[11]方法。取对数生长期大肠杆菌(*E. coli* K-12)离心沉淀菌体, 以 0.1 mol/L、pH 6.4 磷酸缓冲液悬浮细菌, 调整菌液浓度, 使 570 nm 的光吸收值为 0.3~0.5; 每 ml 菌液加 10 μl 待测样品, 以磷酸缓冲液作空白对照; 37 ℃ 水浴 30 min, 迅速冰浴, 测 570 nm 的光吸收值。按公式: $U = \sqrt{(A_0 - A)/A}$, 计算抗菌肽的杀菌活力单位 U, 其中 A_0 为空白对照在 570 nm 的光吸收值, A 为处理样品在 570 nm 的光吸收值。

1.3 对水产常见病原菌的抑菌实验

1.3.1 纸片扩散法 根据文献[2, 12]并加以改进, 用纸片扩散法对抑菌效果进行测定。供试菌株分别配成 0.3×10^8 cfu/ml 的菌悬液, 按 0.1 ml/平板的量均匀涂布于营养琼脂平板(直径 9 cm), 贴上无菌滤纸片(直径 6 mm), 在各个滤纸片上分别滴加 10 μl(1.2 μg)、20 μl(2.4 μg)的抗菌肽, 同时滴加 10 μl、20 μl 无菌生理盐水的空白对照。4 ℃ 静置 3 h, 28 ℃ 恒温培养过夜, 测定抑菌圈的大小以判断抗菌肽的抑菌效果。

1.3.2 试管稀释法测抗菌肽的最小抑菌浓度(MIC) 用营养肉汤, 按倍比稀释法^[12]将抗菌肽稀释成 8、4、2、1 μg/ml 4 个不同质量浓度, 每 1.6 ml 分别加入浓度为 3×10^8 cfu/ml 的细菌悬液各 200 μl, 同时设不含抗菌肽的空白对照组, 28 ℃ 恒温培养。用 ATB 比浊器(生物-梅里埃出品的 ATB Expression 自动细菌鉴定仪所配浊度计)定时测定各实验组的比浊度, 检测抗菌肽的抑菌效果。同时各实验组定时分别取 30 μl 接种于营养平皿, 28 ℃ 恒温培养过夜, 观察细菌存活情况。

1.4 抑菌作用的超微结构观察

取 28 ℃ 恒温培养过夜的嗜水气单胞菌悬液 0.1 ml 与等量的抗菌肽原液均匀混合, 室温下静置 30 min, 磷钨酸负染后于透射电子显微镜下进行抗菌肽抑菌作用的超微结构观察; 同时设不加抗菌肽

的空白对照。

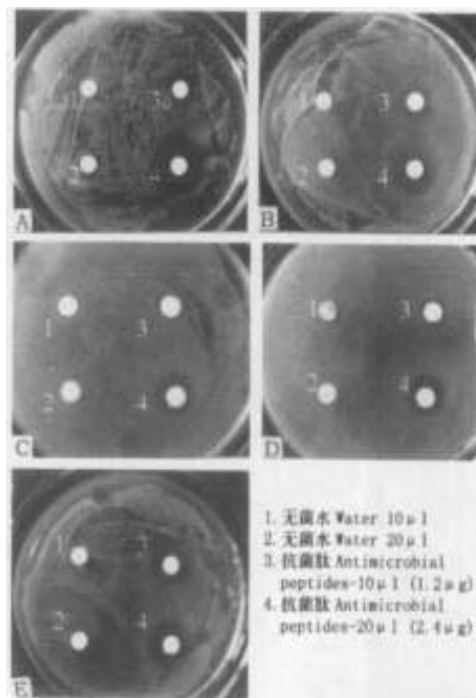


图1 抗菌肽对细菌的抑菌效果

Fig.1 Antibacterial effects of antimicrobial peptides to bacteria

A. 大肠杆菌 *E. coli* K-12 B. 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* C. 梅氏弧菌 *Vibrio metschnikovi* D. 迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* E. 温和气单胞菌 *A. sobria*

2 结果

2.1 重组抗菌肽的制备

经 72 h 发酵, 基因工程酵母菌菌体吸光值 OD 达 10, 湿菌体达 120 g/L。采用 Hultmark 方法, 测得发酵上清的杀菌效价为 5 000 U/ml。发酵上清液经 CM-Sephrose FF 柱吸附和 0.05~1 mol/L 乙酸铵缓冲液(pH 5.2)梯度洗脱, 合并含有抗菌肽组分的峰, 经测定, 收集到的纯化样品总蛋白含量为 120 μg/ml, 杀菌效价为 4 800 U/ml。

2.2 抑菌效果

2.2.1 纸片扩散法 重组抗菌肽对 4 种水产养殖病原菌和大肠杆菌的抑菌效果见图 1 和表 1。结果表明, 当抗菌肽含量为 1.2 μg/片时, 4 个实验组都出现了抑菌圈, 从表 1 还可看出抗菌肽对嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的抑菌作用比对梅氏弧菌和迟钝爱德华氏菌强。

表1 不同含量抗菌肽的抑菌效果

Table 1 Antibacterial effects on different content of Antimicrobial peptides

抗菌肽 Antimicrobial peptides		抗菌圈直径/mm Diameter of bacteriostasis ring				
总蛋白含量/($\mu\text{g} \cdot \text{die}^{-1}$) Content of total protein	杀菌效价/($\text{U} \cdot \text{die}^{-1}$) Bactericidal titer	大肠杆菌 <i>E. coli</i> K-12	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	梅氏弧菌 <i>V. metschnikovi</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
0	0	-	-	-	-	-
1.2	48	14	11	9	8	10
2.4	96	19	17	14	12	15

注:“-”表示无抑菌效果。“-” means no bacteriostasis.

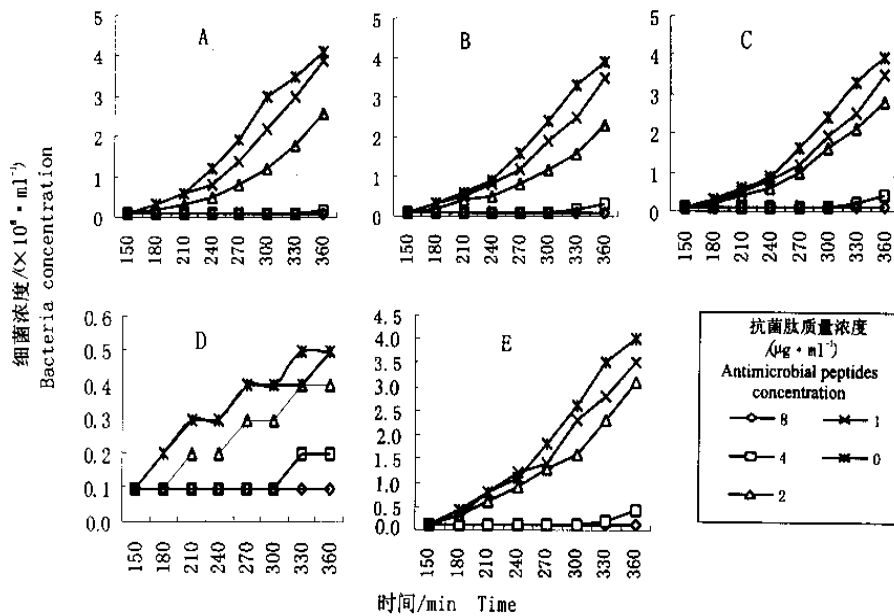


图2 病原菌在不同浓度抗菌肽中的生长曲线

Fig.2 Growth curves of pathogenic bacteria at different antimicrobial peptides concentrations

A. 大肠杆菌 *E. Coli*; B. 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*; C. 梅氏弧菌 *Vibrio metschnikovi*; D. 迟钝爱德华氏菌 *Edward-siella tarda*; E. 温和气单胞菌 *Aeromonas sobria*.

2.2.2 试管稀释法 抗菌肽抑菌效果的实验结果见图2和表2。图2所示的生长曲线表明,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (即160 U/ml)质量浓度的抗菌肽已具有抑菌效果,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (即320 U/ml)质量浓度的抗菌肽具有杀菌作用,抗菌肽对细菌要经过大约30 min,才能达到其杀菌功效。

2.3 抑菌过程的超微结构观察

电子显微镜超微结构观察显示,嗜水气单胞菌的正常菌体有明确的细胞界限、完整的细胞结构;经抗菌肽的作用后,细胞界限变得不清、细胞内容物外渗导致菌体裂解(图3)。

表2 抗菌肽对嗜水气单胞菌各时间段的抑菌作用

Table 2 Antibacterial action of antimicrobial peptides to *A. hydrophila* at different time

作用时间/min Reaction time	抗菌肽浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Concentration of antimicrobial peptides				
	8	4	2	1	0
15	+	+	+	+	+
30	+	±	+	+	+
45	±	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+
75	-	+	+	+	+
90	-	+	+	+	+

注: + 一细菌存活状况与对照组相当 The survival state of bacteria is the same as control; - 细菌死亡 Bacteria dead; ± 细菌存活状况较差 The survival state of bacteria is poor.

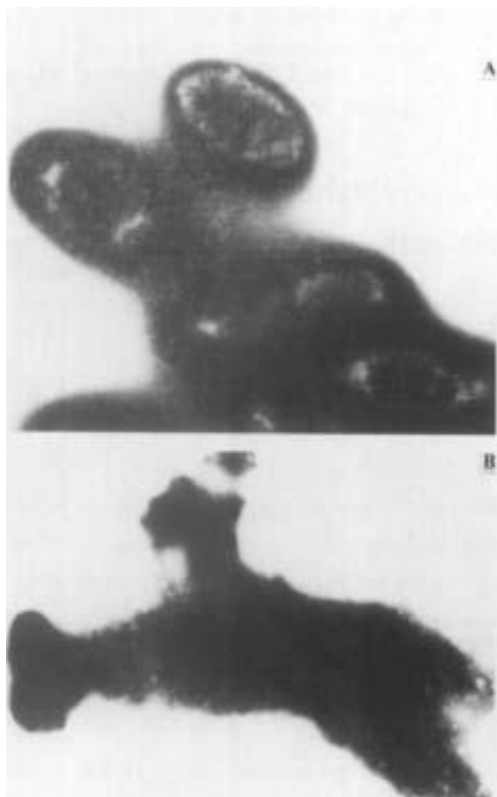


图3 嗜水气单胞菌的超微结构观察

Fig.3 Ultrastructure observation of *A. hydrophila*

A. 正常菌体($\times 10\ 000$) Normal bacteria; B. 裂解的菌体($\times 20\ 000$) Lytic reaction of bacteria

3 讨论

近年来,抗菌肽和抗菌肽基因工程的研究与开发有了长足的进展。1987~1998年国际 GenBank 登录的不同载体的昆虫抗菌肽基因就有 29 种之多,并且已有多种抗菌肽基因在不同的表达系统中得到成功表达,已在医药和农业病害防治中发挥着重要的作用^[1]。

嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、爱德华氏菌及弧菌是水产养殖中常见的病原菌,尤其是嗜水气单胞菌和温和气单胞菌更普遍存在于水环境中,因此选用这 4 种病原菌为实验菌株以检测抗菌肽对水产常见病原菌的抑菌效果具有一定的代表性。有文献报道,抗菌肽对绝大部分受试的动植物革兰氏阳性致病菌具有很强的杀伤力^[2]。由于水生病原菌主要为革兰氏阴性菌,本实验的 4 种菌均为革兰氏阴性病原菌。结果表明,抗菌肽对供试菌亦具有较好的

杀菌作用。

实验结果表明,抗菌肽杀菌效果与抗菌肽和病原菌之间量的比例有关,必须有足够量的抗菌肽活性分子作用于细菌个体,才能杀死细菌达到抑制细菌生长的目的;若抗菌肽活性分子不足以作用于绝大多数的细菌个体,在抗菌肽杀菌的同时,没受到抗菌肽作用的菌体还可以继续繁殖生长,当细菌的数量增殖到一定水平时,抗菌肽就失去抑菌效果。与抗菌素相比,用于细菌药物敏感试验的药敏纸片的抗菌素含量最小都在 $5\ \mu\text{g}/\text{片}$ 以上,而本实验中的抗菌肽用量最大仅 $2.4\ \mu\text{g}/\text{片}$;说明抗菌肽具有较强的抑菌效果,也说明其杀菌效率高。

抗菌肽抑菌过程的超微结构观察表明,抗菌肽的抑菌方式是通过作用于细菌的细胞膜,导致菌体裂解而死亡。这种杀菌机理可能是抗菌肽具有广谱杀菌作用和不易产生耐药性或抗药性的原因之一。因此,探讨抗菌肽在水产养殖病害防治上的应用更具有重要意义。我们已将基因重组抗菌肽的发酵产物浓缩干燥,添加到饲料中,用于中华鳖红脖子病、赤斑病、穿孔病等一些常见病的防治实验,初步结果表明对这几类病害都具有良好的防治效果,其实验结果将另行报道。

参考文献:

- [1] 叶 星,白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 274 - 279.
- [2] 黄自然,郑庭辉,梁怡章,等. 柞蚕抗菌肽的抑菌效果[J]. 科学通报, 1986, 14: 1 107 - 1 109.
- [3] 简玉瑜,吴新荣,莫豪葵,等. 应用基因枪将柞蚕抗菌肽基因导入水稻获得抗白叶枯病株系[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 1 - 7.
- [4] 陈善春,张进仁,黄自然,等. 根瘤杆菌介导柞蚕抗菌肽 D 基因转化柑桔研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(3): 7 - 13.
- [5] 陈善春,张进仁,黄自然,等. 抗菌肽基因介导的柑桔抗溃疡病基因工程研究[J]. 中国农业科学, 1996, 29(1): 94.
- [6] 韩献萍,彭朝晖,黄自然,等. 柞蚕抗菌肽 D 对宫颈癌细胞系和阴道毛滴虫生长的损伤作用[J]. 生物技术通讯, 1994, 5: 1 - 4.
- [7] Alexander Cole. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder[J]. Am Soc Biochem Molec Bio Inc, 1997, 272(18): 12 008 - 12 013.
- [8] Kjuul A K, Bullesbach E E. Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish[J]. J Fish Dis, 1999, 22: 387 - 394.
- [9] 郑 青,黄自然,姚汝华,等. 人工合成 Cecropin AD 基因在酵母中表达[J]. 蚕业科学, 1998, 25(3): 175 - 180.
- [10] 屠益增,驱贤铭,许延森,等. 家蚕抗菌肽 CM₂ph₁ 的分离、纯

- 化、结构及其性质的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1989, 32: 474-480.
- [11] Hultmark D, Steiner H. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalopra ceropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [12] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌, 等. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992. 66-68, 76-84.

Preparation of recombinant antimicrobial peptides and its antibacterial effects on fish-pathogenic bacteria

JIANG Lan¹, BAI Jun-jie¹, DENG Guo-cheng¹, HUANG Zi-ran²

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The recombinant antimicrobial peptides was prepared by ferment in YEPD (30 ℃, pH 6.0~6.5) for 36 h and induced by methanol. After 72 h ferment, the activity of recombinant antimicrobial peptides expressed by recombinant yeast in the medium can reach as high as 5 000 U/ml. By paper diffusion method and tube dilution method, the antibacterial effects of antimicrobial peptides on the fish-pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio metschnikovi*, *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas sobria* are determined that the minimal inhibitory concentration (MIC) is 4 µg/ml and the minimal lethal dose (MLD) is 8 µg/ml. The ultrastructure observation under electron microscopy shows that the bactericidal mechanism of antimicrobial peptides is to make the bacterial cell lytic, which leads to the bacteria death.

Key words: gene recombinational antimicrobial peptides; antibacterial effect; *Aeromonas hydrophila*; *Vibrio metschnikovi*; *Edwardsiella tarda*; *Aeromonas sobria*

书讯:

《中国水产标准汇编》出版发行

为满足渔业生产、管理和开展水产品贸易活动的需要,农业部渔业局、全国水产标准化技术委员会和渔船标准化技术委员会将近年来(截止到2001年底)陆续发布的水产国家标准、行业标准汇编成册,现已出版发行。该标准可供广大渔业及与渔业有关的生产、经营、管理、质量检验、科研、教学单位使用和参考。

“水产养殖与水产品加工卷”共汇集了37项标准。本卷主要内容有养殖鱼类种质、亲本、苗种标准,养殖技术规范,饲料,鲜、冻水产品,水产加工品标准,水产品检测方法标准及按危害分析与关键控制点(HACCP)原则制定的水产品质量管理规范等。

“船网机具卷”共汇集了72项标准,本卷主要内容有渔业机械术语标准,渔具制作标准,渔业机械、渔业仪器产品标准,渔业机械检验标准,渔船设备及安装标准,玻璃钢渔船制作标准和渔船修理标准等。

《中国水产标准汇编》(水产养殖与水产品加工卷及船网机具卷)每套120元(含邮费)。请需要标准的单位或个人汇款至:北京市丰台区青塔村150号,邮编:100039,中国水产科学研究院质量标准办公室。也可通过银行汇款:北京工商银行永定路分理处,户名:中国水产科学研究院,帐号:14442828(请注明:购标准款)。联系电话:010-68673936。