

中国对虾中抗菌短肽的分离纯化与功能分析

安贤惠^{1,2}, 梁建国¹, 李卫国², 徐春花¹, 吕毅¹, 王旭¹, 董靖¹, 张崇星¹, 张克云¹

(1. 南京农业大学 生命科学院, 江苏 南京 210095; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要:以水产病害的病原菌为目标菌, 从中国对虾(*Penaeus chinensis*)体液中分离筛选抗菌肽, 通过 Sephadex G-50、RP-HPLC 等分离纯化技术, 得到一种抑制水产病原菌的抗菌肽 PC-V-2。经初步鉴定, 该抗菌肽具有广谱抗性, 不仅抗鲁克氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*), 而且对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)等革兰氏阳性菌, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)等革兰氏阴性菌和白色念珠菌(*Candida albicans*)等真菌也有较强的抗性。另外, 该抗菌肽还有一定的抑制凝血的活性, 但没有检测到溶血和丝氨酸蛋白酶抑制活性。经 MALDI-TOF 质谱分析, 其分子量为 1 848 D, 但其序列及其他生物特性还有待进一步研究。[中国水产科学, 2006, 13(6): 1 012-1 016]

关键词:中国对虾; 抗菌肽; 分离纯化; 鲁克氏耶尔森氏菌

中图分类号: S94; Q959. 223; Q51; R93

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-1012-05

自 1981 年首次报道抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)^[1]以来, 抗菌肽的研究已经成为热点, 诸多研究表明, 抗菌肽广泛存在于细菌、植物、脊椎和无脊椎动物中, 是先天免疫系统中的重要因子。海洋生物抗菌肽的研究由日本学者 Nukamua 等^[2]从亚洲鲎(*Tachypleus tridentatus*)中发现抗菌肽开始, 20 世纪 90 年代中期得以迅速发展, 目前已从蓝蟹(*Callinectes sapidus*)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、柄海鞘(*Styela clava*)和贻贝(*mussel*)等多种海洋生物中分离到多种抗菌肽^[3]。本研究以水产病害的病原菌为目标菌, 从中国主要经济海产品中国对虾(*Penaeus chinensis*)中筛选抗菌肽, 旨为水产病害的生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中国对虾采自江苏省连云港市赣榆县某对虾养殖场; Sephadex G-50 为 Amersham Biosciences 产品, 乙腈为德国 Merk Lichrosolv 液相色谱专用试剂; 实验用菌种鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鲁克氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌

(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和白色念珠菌(*Candida albicans*), 均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 中国对虾体液的收集 将中国对虾断尾后从尾提起, 让其体液自然流出或手工辅助挤出, 所收集样品立即用高速冷冻离心机在 4℃, 10 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液分装, -20℃保存备用。

1.2.2 抗菌肽的分离纯化 Sephadex G-50 用蒸馏水煮沸 2 h 溶胀^[4], 装入 2.6 cm × 100 cm 层析柱, 用含 0.1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)平衡、洗脱, 流速 0.3 mL/min, 每管收集 3 mL, 测定 A₂₈₀ (当读数小于 0.050 时该管不予收集), 以管号为横坐标、A₂₈₀ 为纵坐标, 如图 1。

将经 Sephadex G-50 所收集的第五峰即 PC-V 冷冻干燥, 用少量超纯水溶解(以刚好完全溶解为准), 用超纯水透析 6 h, 中间换水 2 次, 透析内液分装冷冻备用。将透析内液用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化, 上样量 100 μL, 流速 0.7 mL/min, 按下列程序进行梯度洗脱: 流动相 A(0.1% 三氟乙酸水溶液), 流动相 B(含 0.1% 三氟乙酸的液相色谱专用乙腈), 如图 2 所示进行梯度洗脱。

收稿日期: 2006-01-22; 修订日期: 2006-05-06.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30200044/C01040101); 南京农业大学青年创新基金项目(Y200417).

作者简介: 安贤惠(1965-), 女, 副教授, 硕士, 从事海洋生物资源及活性物质研究. E-mail: anxh2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 张克云. Tel.: 025-84396849; E-mail: keyunzhang@njau.edu.cn

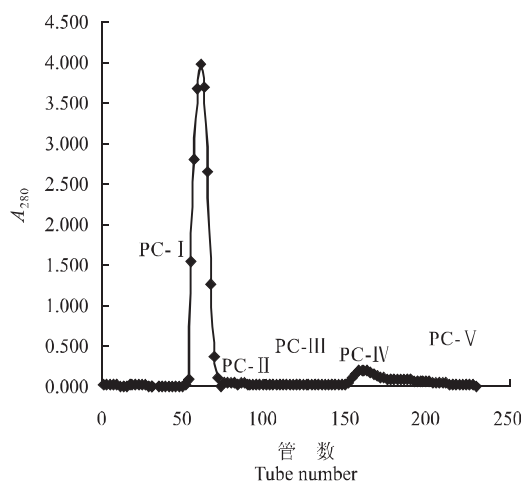


图1 Sephadex G-50 凝胶过滤

PC-I: 管数 51 ~ 74; PC-II: 管数 75 ~ 106; PC-III: 管数 107 ~ 148; PC-IV: 管数 149 ~ 182; PC-V: 管数 183 ~ 220.

Fig. 1 Sephadex G-50 Gel chromatography

PC-I: Tube nos. 51 ~ 74; PC-II: Tube nos. 75 ~ 106; PC-III: Tube nos. 107 ~ 148; PC-IV: Tube nos. 149 ~ 182; PC-V: Tube nos. 183 ~ 220.

1.2.3 抗菌活性检测 采用抑菌圈法^[5]在 2216E 平板培养基中分别涂布鳃弧菌、嗜水气单胞菌和鲁克氏耶尔森菌,在 LB 平板培养基中分别涂布大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌,在直径为 1 cm 的滤纸片上分别滴加 20 μ L 中国对虾体液原液和经上述分离纯化到的多肽(分离峰),以无菌水(CK₁)、相应缓冲液(CK₂)为对照,分别在 28 $^{\circ}$ C (2216E 培养基)和 37 $^{\circ}$ C (LB 培养基)恒温培养,观察滤纸片周围是否有抑菌圈,并度量抑菌圈的大小。抗菌活性强弱用抑菌圈直径 ϕ 表示(数值等于抑菌圈外径减滤纸直径,为 3 次重复的算术平均值),当 $\phi > 1.5$ mm、 1.5 mm $\geq \phi > 1.0$ mm、 1.0 mm $\geq \phi > 0.5$ mm、 0.5 mm $\geq \phi > 0.1$ 和 $\phi = 0$ 时,分别用“++++”、“+++”、“++”、“+”和“-”表示。每次纯化过程跟踪检测抗菌活性,重复 3 次。

1.2.4 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测^[6] 依次在 1 cm $\times$ 0.5 cm 玻璃比色杯中加入 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 410 μ L, 0.4% (w/v) Trypsin 50 μ L, PC-V 溶液 30.2 mg/mL (冻干粉用 0.1 mol/L PBS, pH 6.0 溶解) 20 μ L,准确计时,在室温下保温 5 min 后,加入 0.2% (w/v) 发色底物 N- α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (简写 NBLAN) 40 μ L 启动反应,迅速置入比色池,于 405 nm 波长下自动扫描 2 min,监测酶促动力学反应。以缓冲液代替

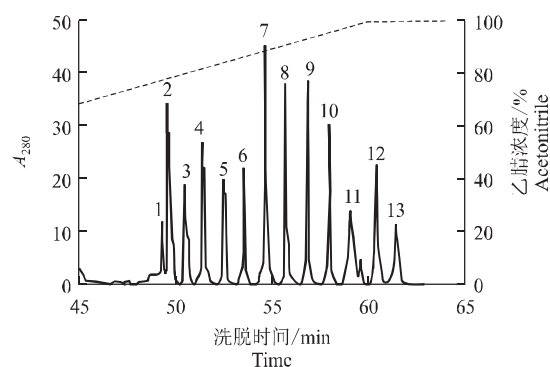


图2 RP-HPLC 分离 PC-V 洗脱梯度及结果示意图

Fig. 2 Condition and results of RP-HPLC

PC-V 为对照,通过比较 ΔA 值检测丝氨酸酶抑制剂活性。

1.2.5 体外凝血活性测定^[7] 取 PC-V 溶液(冻干粉 30.2 mg 用 0.1 mol/L PBS 1 mL pH 6.0 溶解) 20 μ L 于 15 mm $\times$ 100 mm 试管中,以 PBS 代替 PC-V 溶液为对照,37 $^{\circ}$ C 保温 5 min,加入 100 μ L 含 2.5% 柠檬酸钠鸡血浆和 6.25 μ L 0.4 mol/L 的 CaCl₂,开始计时,每隔 10 s 倾斜试管检查一次,当反应体系表面不再流动时记录所需时间即为血浆凝固时间。

1.2.6 溶血活性测定^[8] 取新鲜鸡血置于含柠檬酸钠(终质量分数为 0.38%)的离心管中,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 0.85% 生理盐水洗涤红细胞沉淀若干次,至上清液呈现无色为止,将洗涤好的红细胞加生理盐水稀释成 $10^7 \sim 10^8$ /mL 浓度的悬浮液备用。取红细胞悬浮液 20 μ L,分别加 PC-V 溶液 10 μ L、20 μ L、30 μ L、40 μ L,用生理盐水补足至 1.6 mL,2 000 r/min 离心 5 min,上清液于 540 nm 测吸光值。溶血活性与吸光值成正比。

1.2.7 分子量测定 中国对虾 PC-V 经 RP-HPLC,有 13 个峰分离较好,分别予以收集,经抗菌性检测,对其中编号为 2 即 PC-V-2 的抗菌肽进行分子量测定,即飞行质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry)

测定。该对虾抗菌肽的溶解液为 100% 的乙腈,其中含有 2-cyano-4-hydroxycinnamic acid(HCCA)。

2 结果

2.1 中国对虾中抗菌肽的分离纯化

Sephadex G-50 凝胶层析图谱如图 1, 分别收集 PC- I (51 ~ 74)、PC- II (75 ~ 106)、PC- III (107 ~ 148)、PC- IV (149 ~ 182)、PC- V (183 ~ 220)产物峰。

将具有抗菌活性的 PC- V 峰产物冷冻干燥,再溶解、透析,经 RP-HPLC 进一步分离纯化,共收集分离效果较好的 13 个峰产物,依次命名为 PC- V-1、PC- V-2、…、PC- V-13,图 2、表 1 中分别依次简写为 1 ~ 13,分离图谱见图 2。

2.2 抗菌活性检测

经 Sephadex G-50 收集到的 PC- V 峰和经反相高效液相色谱分析分离到的 13 个峰,分别进行抗菌性检测,结果如表 1 所示。PC- V 的 RP-HPLC 产物 1 ~ 13 分别对大肠杆菌,枯草杆菌,金黄色葡萄球菌,白色念珠菌表现出不同程度的抗性,进而研究具有广谱抗性的 2 峰即 PC- V-2 对虾蟹类和淡水鱼类病害的病原菌鳃弧菌、嗜水气单胞菌和鲁克氏耶尔森菌的抗菌作用,结果检测到 PC- V-2 (OD₂₈₀ = 0.008)对鲁克氏耶尔森菌的抗性作用。当然这一抗菌肽的最低抗性剂量和作用机理还有待于进一步研究。

表 1 中国对虾抗菌肽的抗菌活性检测
Tab. 1 Antimicrobial activity of *Penaeus chinensis*

菌种类型 Type of strain	PC-V	PC-V 反相液相色谱结果* The products of RP-HPLC from PC-V*												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	++	++	++	++	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
枯草杆菌 <i>B. subtilis</i>	+	++	+	++	++	+	+	++	+++	+	++	+	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-	++	++	-	++	-	++	+	+	-
白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	+++	-	++	+	-	-	+	+	-	-	++	-	-	-
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	-	/	-	-	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	-	/	-	-	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/
鲁克氏耶尔森氏 <i>Y. ruckeri</i>	++	/	+	-	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/

注:“/”未做此项内容;“※”RP-HPLC 洗脱峰见图 2。
Note:“/” not detected;“※” The peak of each product was shown in Fig. 2.

2.3 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测

对 PC- V 及其 RP-HPLC 产物进行了丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测,但均未检测到抑制效应(数据未列入),即所分离到的 PC- V 及其 RP-HPLC 分离物不具备丝氨酸蛋白酶抑制剂活性。

2.4 凝血和溶血活性测定

由于 RP-HPLC 分离物产量较低,此项目只对

PC- V 进行。结果表明,PC- V 具有一定的抑制凝血作用(表 2),而未检测到溶血活性(数据未列入)。

2.5 分子量测定

中国对虾 PC- V-2 抗菌肽经 MALDI-TOF MS 检测,结果见图 3。由图可见,PC- V-2 抗菌肽的分子量为 1 848 D。

表 2 中国对虾抗菌短肽 PC-V 体外抗凝血活性
Tab. 2 Anticoagulating effect of PC-V in vitro

项目 Item	PBS(20 μL)			G-50 第 5 峰(20 μL)		PC-V
	I	II	III	I	II	III
血浆/μL Plasm	100	100	100	100	100	100
氯化钙/μL CaCl ₂	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
凝血时间/s Clotting time	410	420	410	650	660	660
凝血时间平均值/s Average clotting time		413			657	

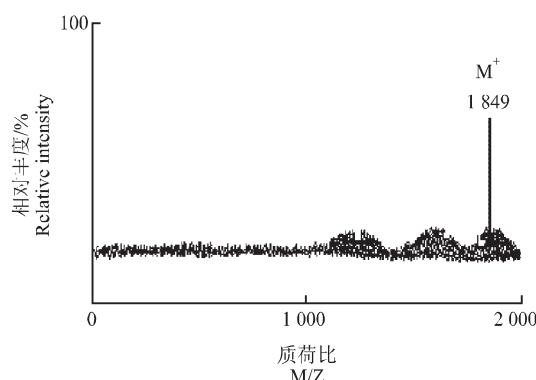


图3 质谱分析图

Fig. 3 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

3 讨论

本研究除选用大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌等指示菌外,还选用鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鲁克氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)等3种水产细菌性病原菌,前两者是虾类、蟹类和贝类等海产品的主要病害病原,后者是中国主要淡水养殖鱼类暴发性流行病病原菌之一,以它们为目标菌筛选抗菌肽在国内报道的较少。

实验发现,PC-V-2对鲁克氏耶尔森氏菌表现出抗菌活性,这是第一次在中国对虾中发现。说明从大宗经济水产品中找到天然抗菌肽是有可能的。如果将这种无污染、不易产生抗性的抗菌肽进一步通过分子生物学手段,使其高效重组表达,使其用于水产饲料添加剂来防治水产病害,可达到健康养殖的目的。本研究只是初步阶段,其纯品的获得、结构和功能的鉴定以及作用机理研究等还有待进行。

PC-V-2除对鲁克氏耶尔森氏菌表现出抗菌活性外,对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,白色念珠菌,枯草杆菌等均表现出一定的抑制作用,对其深入研究,有望从中国对虾体液中得到具有较高抑菌效果的广谱活性多肽。

PC-V-2经MALDI-TOF检测,其分子量为1848 D。从分子大小而言不同于笔者从中国对虾中分离到的PC-III系列抗菌肽^[9],其分子量为1071 D和1311 D;亦不同于康翠洁等^[10]由凡纳滨对虾推断的理论抗菌肽,其分子量为5652 D。PC-V-2的其他生物活性有待进一步研究。

体外凝血实验表明,含PC-V-2的混合物PC-V具有一定的抗凝血作用,但其有效浓度或使用剂量还需进一步研究探讨。

致谢:感谢江苏省省委组织部江苏省“333”人才工程的资助,感谢淮海工学院化工系液相色谱室的支持和刘玉芬老师的帮助。

参考文献:

- [1] Boman H G, Steiner H. Humoral immunity in cecropia pupae[J]. Curr Top Microbial Immunol, 1981, 94: 75-91.
- [2] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure[J]. J Biol Chem, 1988, 263(32): 16709-16713.
- [3] 洪旭光, 孙修勤, 张进兴, 等. 海洋抗菌肽研究进展[J]. 高技术通讯, 2004, 14(2): 105-110.
- [4] 李建武, 肖能, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 36-46.
- [5] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 101-102.
- [6] 王利菊, 高国富, 柏士平, 等. 中华硬蜱凝血酶抑制剂的分离纯化与活性[J]. 动物学研究, 2005, 26(3): 328-331.
- [7] Lai R, Takeuchi H, Jonczy J, et al. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*[J]. Gene, 2004, 342: 243-249.
- [8] 刘善庭. 药理学实验[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 117-118.
- [9] 安贤惠, 吕毅, 李卫国, 等. 中国对虾PC2 III系列抗菌肽的分离纯化与活性[J]. 动物学研究, 2005, 26(4): 410-415.
- [10] 康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 中国对虾抗菌肽成熟肽的cDNA克隆[J]. 山东大学学报(理学版), 2002, 37(6): 552-556.

Isolation and purification of a novel antimicrobial peptide from *Penaeus chinensis*

AN Xian-hui^{1,2}, LIANG Jian-guo¹, LI Wei-guo², XU Chun-hua¹, LU Yi¹, WANG Xu¹, DONG Jin, ZHANG Chong-xing¹, ZHANG Ke-yun¹

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: It is one of the important things to find more effective biological medicaments to prevent the disease in aquaculture. The purpose of the study was to get antimicrobial peptide from *Penaeus chinensis* body fluid. Some pathogenic microorganisms were used to detect the activity of the antimicrobial peptides. The results showed that a novel antimicrobial peptide to *Yersinia ruckeri* was isolated and purified from *Penaeus chinensis* by Sephadex G-50 gel filtration and reverse phase high performance liquid chromatography. The molecular weight was 1 848 D determined by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. It had characteristics of broad spectrum. It not only inhibited the growth of Gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, but also Gram negative bacteria such as *Escherichia coli*, especially *Yersinia ruckeri*. It also inhibited *Candida albicans*, a kind of fungi. The peptide could delay the coagulation time as anticoagulant did. No inhibitory effects on activities of serine proteases and hemolysis were observed in current studies. The study on the amino acid sequence and other characters of the peptide are needed in the future. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 1 012 - 1 016]

Key words: *Penaeus chinensis*; antimicrobial peptides; isolation and purification; *Yersinia ruckeri*

Corresponding author: ZHANG Ke-yun. E-mail: keyunzhang@njau.edu.cn

欢迎订阅 2007 年《农业质量标准》

主管 中华人民共和国农业部

主办 中国农业科学院

协办 农业部农产品质量安全中心

承办 中国农科院农业质量标准与检测技术研究所

主要栏目: 本刊特稿、本刊专访、专家点评、专题论坛、政策法规、农产品质量安全、农业标准化、无公害食品行动、标准制定与实施、质量认证与管理、质量监督与检验、检验检测体系建设、农业标准公告、研究与探讨、质检中心之窗、名企名品、市场信息与动态、海外博览、编读园地、广告信息等。

读者对象: 与农产品质量安全和农业质量标准有关的各级农业行政管理、科研教学、检验检测、技术推广、生产企业等部门的有关人员。

本刊为双月刊, 逢双月 10 日出版。大 16 开本, 彩色四封, 56 页。全国各地邮局(所)均可订阅, 也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。邮发代号: 82-223, 每册定价: 6.80 元, 全年共 40.80 元。

通讯地址: 北京中关村南大街 12 号中国农科院质标所

邮政编码: 100081

联系电话/传真: (010)62138026

E-mail: aqs@caas.net.cn

欢迎各界朋友赐教、赐稿、订阅和刊登广告。