

中国林蛙皮抗菌肽的提取纯化及抑菌活性检测

王战勇¹, 李 宁¹, 苏婷婷²

(1. 辽宁石油化工大学环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001;

2. 辽宁石油化工大学化学与材料学院, 辽宁 抚顺 113001)

摘 要: 采用酸化甲醇法提取中国林蛙皮肤中的抗菌肽, 并采用凝胶色谱的方法对提取物进行纯化。结果表明: 采用 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 串联凝胶层析法获取的 F2 组分, 即纯化后的抗菌肽的抑菌率可达 90% 以上。抗菌肽对革兰氏阴性菌和阳性菌以及真菌均有一定抑制效果。对各受试菌株的最小抑菌浓度(MIC)分别为: 金黄色葡萄球菌和链球菌为 0.2mg/mL; 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌为 0.4mg/mL; 蜡样芽孢杆菌为 0.8mg/mL; 白色念珠菌为 1.2mg/mL; 酿酒酵母和毛霉为 1.5mg/mL; 根霉为 2.0mg/mL。

关键词: 中国林蛙; 抗菌肽; 纯化; 抑菌活性

Purification and Anti-bacterial Activity Evaluation of Anti-bacterial Peptides from Skin of *Rana chensinensis*

WANG Zhan-yong¹, LI Ning¹, SU Ting-ting²

(1. School of Environmental and Biological Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China;

2. School of Chemistry and Material Science, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China)

Abstract: *Rana chensinensis* skin was extracted using acidified methanol for preparing anti-bacterial peptides and the resulting crude extract was then purified by gel filtration chromatography. Purified anti-bacterial peptides were found to be rich in F2 fraction up to 90% by tandem Sephadex G-50 and G-25 column chromatography. The purified anti-bacterial peptides could effectively inhibit the growth of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungus. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were 0.2 mg/mL against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus*, 0.4 mg/mL against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, 0.8 mg/mL against *Bacillus cereus*, 1.2 mg/mL against *Candida albicans*, 1.5 mg/mL against *Saccharomyces cerevisia* and *Mucor*, and 2.0 mg/mL against *Rhizopus*.

Key words: *Rana chensinensis*; anti-bacterial peptide; purification; anti-bacterial activity

中图分类号: Q516

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)03-0132-04

抗菌活性肽是生物界中广泛存在的一类生物活性小肽, 一般具有抗细菌或真菌作用, 有些还具有抗原虫、病毒或肿瘤细胞的功能。两栖动物皮肤在自然进化过程中形成了防御病原微生物的三套防御系统, 相应地具有与这些防御系统相适应的特定结构。两栖动物皮肤抗菌肽是其中先天防御系统的主要组成部分。两栖动物皮肤抗菌肽具有高效、广谱、不易产生耐药性等特点^[1-2]。这使其在耐抗生素病原菌株大量涌现的今天有望成为新一代的临床抗菌药物^[3-4], 并成为当前的研究热点。

中国林蛙(*Rana chensinensis*)是我国传统的名贵药用动物, 俗称哈士蟆, 其药用部分主要是雌性个体的输卵管。东北地区年产林蛙 10 亿余只, 大量的蛙皮尚未被有效的开发应用。林蛙皮肤湿润、裸露, 为抵御环境有害因子侵袭, 在自然选择的过程中, 经长期进化, 其

皮肤分泌液中含有大量具有防御功能的抗菌活性物质^[5-6]。本研究纯化出林蛙皮中的抗菌肽组分, 并进行体外抗菌作用研究, 通过对一些具有代表性的菌株进行考察, 以了解其抗菌谱范围及抗菌强度, 为进一步探讨其抗菌作用机理, 将其开发为低毒、高效药用资源或食物保鲜剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料、试剂与菌种

取林蛙油后的中国林蛙干品由抚顺市东星林蛙精品研究所提供。从取林蛙油后干燥的中国林蛙个体上剥取蛙皮, 尽量除去肌肉等杂质, 用剪刀将林蛙干皮剪碎,

收稿日期: 2009-03-03

作者简介: 王战勇(1978—), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事微生物学及生物化学研究。E-mail: dennistt@126.com

蒸馏水清洗, 自然干燥, 备用。

Sephadex G-50、Sephadex G-25 Pharmacia 公司; BCA protein assay kits 华特生生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、链球菌(*Streptococcus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、根霉(*Rhizopus*)、毛霉(*Mucor*), 以上菌种均为本实验室保藏菌种。

1.1.2 仪器与设备

MF99-3 自动液相色谱分离层析仪 上海沪西分析仪器厂; ALPHA-1-2 冻干机 德国 Chaist 公司; RE-52A/52AA 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; PH4000 型电热恒温培养箱 天津泰斯特仪器有限公司; HZQ-QX 全温振荡器 哈尔滨东联电子技术开发公司; YXQ.SG46.280 型手提式压力灭菌器 上海华线医用核子仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽的提取纯化

将预处理的样品使用酸化甲醇(无水甲醇使用盐酸调节 pH 5.0 所得)按料液比为 1:25(m/V)于 -20℃ 提取 24h。浸提液减压蒸馏, 再经冷冻干燥, 得到抗菌肽粗提物。

取适量粗提物溶于少量蒸馏水中, 直接加样于 Sephadex G-50 柱(1.6cm × 48cm), 用 0.5% 甲醇洗脱, 流速在 3mL/10min, 自动收集每管 3mL, 波长 280nm 处检测紫外光密度(OD_{280nm})收集吸收峰部分并冷冻干燥。

取适量粗提物溶于少量蒸馏水中, 上样于 Sephadex G-50(1.0cm × 48cm)和 Sephadex G-25(1.0cm × 48cm)的串联柱(注意使两根柱子连接处保持最小的柱外体积), 以 0.5% 的甲醇溶液进行洗脱, 用流速在 3mL/10min, 自动收集每管 3mL, 波长 280nm 处检测光密度, 收集具有紫外吸收峰的部分并冷冻干燥。

1.2.2 抑菌率的测定

以大肠杆菌为受试菌, 接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 恒温培养 24h。将适量纯化后冻干所获得的抗菌肽样品用 1mL 蒸馏水溶解, 取 100μL, 加 LB 培养基 30μL 和菌液 70μL(菌液浓度为 5×10^3 CFU/mL)并混匀, 37℃、150r/min 摇床孵育 1h, 取 100μL 涂布于 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 计算菌落数。以蒸馏水为对照组。计算抑菌率。实验重复 3 次, 计算平均值。

$$\text{抑菌率} / \% = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100$$

1.2.3 抗菌肽产率及蛋白质质量浓度的测定

收取具有抑菌活性的分离组分, 冷冻干燥, 计算抗菌肽产率。

$$\text{抗菌肽产率} / \% = \frac{\text{冻干组分质量}}{\text{浸提用林蛙皮质量}} \times 100$$

蛋白质质量浓度测定采用 BCA 法, 使用华特生 BCA protein assay kits 测定。

1.2.4 抗菌肽的抑菌效果

将所有供测试的菌种移接入相对应的培养基(细菌和酵母菌使用 LB 培养基; 真菌使用 PDA 培养基^[7]), 细菌置于 37℃ 恒温培养箱内培养 24h, 霉菌、酵母菌于 28℃ 培养 48h。用接种环挑取菌体或孢子置于 50mL 无菌生理盐水中, 混匀制成菌体悬液或孢子悬液。

采用杯碟法测定抑菌效果, 菌体悬液或孢子悬液均匀涂布于相应的平板培养基, 将牛津杯放置平皿菌层上, 每杯加入 0.2mL 质量浓度为 0.5mg/mL 的抗菌肽溶液, 恒温培养箱中培养(细菌 37℃, 24h; 霉菌、酵母菌 28℃, 48h), 观察培养结果, 测定平皿内抑菌圈直径大小, 实验重复 3 次, 计算平均值。

抗菌肽最小抑菌浓度(MIC)的测定^[8]: 将样品配制成一一系列浓度梯度的溶液。向对应固体培养基平板中分别移取不同浓度的稀释液各 1.0mL, 再分别移取各菌悬液 0.2mL, 均匀涂布后, 在适宜温度下培养, 以不长菌的最低浓度为最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽的提取纯化

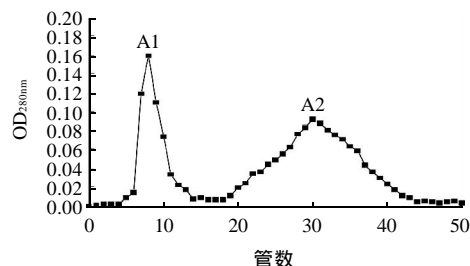


图1 SephadexG-50 凝胶层析图谱

Fig.1 Sephadex G-50 gel filtration chromatogram of acidified methanol extract of *Rana chensinensis* skin

将甲醇浸提所得的粗提物冻干品溶于 2mL 蒸馏水中, 加入于 Sephadex G-50 柱(1.6cm × 48cm)进行层析, 分离得到 2 个吸收峰(A1 和 A2), 如图 1 所示。将粗提物冻干品溶于 2mL 蒸馏水中, 经 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 (均为 1.0cm × 48cm)串联凝胶层析。如图 2 所示, 分离得到 5 个吸收峰(F1、F2、F3、F4 和 F5)。

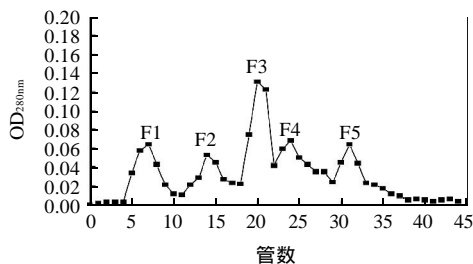


图2 Sephadex G-50 和Sephadex G-25 串联凝胶层析图谱

Fig.2 Tandem Sephadex G-50 and G-25 gel filtration chromatogram of acidified methanol extract of *Rana chensinensis* skin

2.2 各组分抑菌率测定结果

表1 各组分抑菌率测定结果

Table 1 Inhibitory rate of resulting purification fractions in Sephadex G-50 chromatography and tandem Sephadex G-50 and G-25 column chromatography

测定组分	抑菌率/%			均值
	1	2	3	
粗提物	71.4	67.6	73.1	70.7
A1	-	-	-	-
A2	73.4	79.2	77.5	76.7
F1	-	-	-	-
F2	89.4	92.4	88.9	90.2
F3	7.3	4.4	5.1	5.6
F4	29.4	37.5	32.8	33.2
F5	-	-	-	-

注：- 表示无抑菌现象发生，即抑菌率为0。

由表1可知，单独使用 SephadexG-50 进行分离所得的两个吸收峰中，A2 峰具有抑菌活性，而使用 SephadexG-50 和 SephadexG-25 进行串联凝胶层析时，分离效果明显优于单独使用 SephadexG-50 的分离结果。所得的5个吸收峰中F2和F4峰有明显抑菌活性，其中F2峰活性较强。抑菌率可达90%以上，为林蛙皮抗菌肽的主要抑菌组分。F3峰也有微弱抑菌活性，但很可能是未完全分离的F2峰或F4峰组分带来的结果。因此以 SephadexG-50 和 SephadexG-25 进行串联凝胶层析法纯化抗菌肽的方法较好，其中的F2组分可作为抗菌肽组分。

2.3 抗菌肽的产率

收集到的组分的蛋白质质量浓度及抗菌肽产率如表2所示。

表2 收集到的组分的蛋白质质量浓度和抗菌肽产率

Table 2 Protein concentrations and yield of anti-bacterial peptides in resulting purification fractions in Sephadex G-50 chromatography and tandem Sephadex G-50 and G-25 column chromatography

测定组分	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	液体体积/mL	抗菌肽产率/%
粗提液	3.1	200	6.2
G50的A2组分	7.2	60	4.3
G50+G25的F2组分	5.8	9	0.7
G50+G25的F4组分	5.0	12	0.9

2.4 抗菌肽对不同菌种的抑菌结果

综上选取抑菌效果最好的组分即 SephadexG-50 和 SephadexG-25 进行串联凝胶层析所得的F2组分作为抗菌肽组分进行抑菌实验。抗菌肽对不同微生物的抑菌效果见表3。

表3 抗菌肽对不同菌种的抑菌直径

Table 3 Mean inhibitory diameters of fraction F2 (shown in Fig. 2) with optimal antibacterial activity against different species of microbes (from three replicates)

测试菌种	抑菌圈直径/mm			
	D ₁	D ₂	D ₃	D均值
金黄色葡萄球菌	21	18	19	19.3
枯草芽孢杆菌	17	14	13	14.7
蜡样芽孢杆菌	15	13	15	14.3
大肠杆菌	11	13	9	11.0
链球菌	22	24	23	23.0
白色念珠菌	12	9	11	10.7
酿酒酵母	11	13	10	11.3
根霉	9	14	13	12.0
毛霉	11	13	8	10.7

由表3可知，抗菌肽对所测试的各种革兰氏阳性菌、阴性菌以及真菌均有一定的抑制效果，对于金黄色葡萄球菌和链球菌的抑菌效果最为显著。对受试革兰氏阳性菌有较强抑制作用，对受试革兰氏阴性菌的抑制作用相对较弱，对真菌的抑制效果相对最弱。

表4 抗菌肽最小抑菌浓度的测定

Table 4 Minimum inhibitory concentrations of fraction F2 (shown in Fig.2) with optimal antibacterial activity against different species of microbes

测试菌种	抗菌肽粗提物质量浓度/(mg/mL)								
	2.0	1.5	1.2	1.0	0.8	0.4	0.2	0.1	0
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	++++
枯草芽孢杆菌	-	-	-	-	-	-	+	++	++++
蜡样芽孢杆菌	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++
大肠杆菌	-	-	-	-	-	-	+	+++	++++
链球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	++++
白色念珠菌	-	-	-	+	+	++	+++	+++	++++
酿酒酵母	-	-	+	+	++	+++	+++	++++	++++
根霉	-	+	+	+	++	+++	+++	++++	++++
毛霉	-	-	+	++	+++	+++	++++	++++	++++

注：- 无菌生长；+ 有少量菌落生长；++ 有不超过1/3平皿面积的菌落生长；+++ 有不超过1/2平皿面积的菌落生长；++++ 有超过1/2平皿面积的菌落生长。

由表4可知，对各供试菌株的最小抑菌浓度：金黄色葡萄球菌和链球菌为0.2mg/mL；枯草芽孢杆菌和大肠杆菌为0.4mg/mL；蜡样芽孢杆菌为0.8mg/mL；白色念珠菌为1.2mg/mL；酿酒酵母和毛霉为1.5mg/mL；根霉为2.0mg/mL。

3 结 论

本研究采用酸化甲醇法提取中国林蛙皮肤中的抗菌肽并对采用凝胶色谱的方法对提取物进行纯化。提取方法工艺简单,成本较低。采用 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 串联凝胶层析法获取的抗菌肽的抑菌率可达 90% 以上。抗菌肽对常见的革兰氏阴性菌和阳性菌以及真菌均有一定抑制效果,因此在食品防腐和医药领域具有一定的开发前景。

参考文献:

- [1] MOHAMED F A, SOTO A, KNOOP F C, et al. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1550(1): 81-89.
- [2] ISSACSON T, SOTO A, IWAMURO S, et al. Antimicrobial peptides with atypical structural feature from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*[J]. *Peptides*, 2002, 23(3): 419-425.
- [3] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415: 389-395.
- [4] SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?[J]. *Biopolymers*, 1998, 47(6): 435-450.
- [5] 姚文兵, 刘煜, 余江河, 等. 蛙皮活性提取物的抗炎作用和体外抗菌活性研究[J]. *中国药科大学学报*, 1995, 26(5): 314-317.
- [6] 傅南雁, 许传喜. 抗菌肽研究进展[J]. *生命的化学*, 1998, 18(2): 25-29.
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验*[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 215-221.
- [8] 高莹, 张坤生, 任云霞. 甘薯叶提取物提取工艺及其抑菌作用的研究[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(1): 74-78.