

一种中华稻蝗成虫抗菌蛋白质的初步分离

李 婷¹, 宋 强², 邢志国¹, 黄登宇^{1,3}

(1. 山西大学 生物技术研究所, 山西 太原 030006; 2. 山西中医学院 基础部, 山西 太原 030024; 3. 山西省食品药品监督管理局, 山西 太原 030012)

摘 要:目的 提取中华稻蝗成虫中的抗菌蛋白质并测定其抗菌活性。方法 对中华稻蝗成虫经针刺损伤和菌液浸泡相接合的方法处理,粗提液经沸水浴热变性、凝胶过滤色谱、高效液相色谱分析,初步分离中华稻蝗成虫中的抗菌蛋白质,以金黄色葡萄球菌为指示菌,抑菌圈法检测其抗菌活性。结果 经高效液相色谱分析表明中华稻蝗成虫中能产生抗菌蛋白质,其相对分子质量约为 3 600。结论 首次从直翅目昆虫中华稻蝗中分离到对革兰阳性菌有较强活性的抗菌蛋白质。

关键词: 中华稻蝗;分离;抗菌活性;抗菌蛋白质

中图分类号: TQ93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2007)05-0315-03

Isolation of an antibacterial protein from the imago of *Oxya chinensis*

LI Ting¹, SONG Qiang², XING Zhi-guo¹, HUANG Deng-yu^{1,3}

(1. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Department of Basic Sciences, Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China; 3. Shanxi Food and Drug Administration, Taiyuan 030012, China)

Abstract: **Purpose** To isolate antibacterial proteins from imago of *Oxya chinensis* and to study their antibacterial effect. **Methods** The antibacterial proteins were induced by injuring with a needle and then infecting *E. coli*, preliminarily isolating from imago of *Oxya chinensis* through boiled water bath, Sephadex chromatography and HPLC. Their antibacterial activity was detected by plate growth inhibition assay. **Results** After boiled water bath and Sephadex G50 filtration, three antibacterial fractions were obtained, which showed potent antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*, et al. The further analyzed fraction 4 by HPLC indicated that the antibacterial proteins were obtained. The sample was analyzed by MS and the antibacterial protein was a small molecular (about 3 600). **Conclusion** Isolated for the first time antibacterial protein from the orthoptera insect *Oxya chinensis* exhibited a potent antibacterial activity on Gram-positive bacteria.

Key words: *Oxya chinensis*; separation; antibacterial activity; antibacterial protein

昆虫不像高等动物那样有完善专一的免疫体系,缺乏 B 和 T 淋巴细胞,没有免疫球蛋白和补体,但是它们有极强的适应能力和防御能力。大量研究表明,昆虫在感染病菌或体壁受到损伤的情况下能够迅速合成一系列低相对分子质量(M_r)的抗菌蛋白质(多肽),杀死病菌并且阻止病菌的继续侵染^[1]。这些抗菌蛋白质不仅对细菌有抗菌作用,还对部分

真菌、原虫和病毒具有明显杀伤作用,对癌细胞和癌实体瘤有攻击作用而不破坏正常细胞^[2],因此昆虫抗菌肽可能成为抗生素的新来源,具有潜在的医药应用前景。

自 20 世纪 80 年代初,从天蚕中分离到抗菌肽并测定其一级结构^[3]后,昆虫免疫机制的研究成为 1 个非常活跃的领域。迄今已从各类昆虫分离鉴定 200 多个抗菌肽分子,在昆虫系统学上大多是从内生翅类(Lepidoptem)昆虫分离鉴定的,而从不完全变态的外生翅类昆虫分离鉴定抗菌肽的报道较少^[4]。中华稻蝗为外生翅类不完全变态昆虫,直翅目蝗科,其体内成分具有高蛋白质、低脂肪、低胆固醇等特

收稿日期: 2007-01-10; 修回日期: 2007-02-02

作者简介: 李婷(1980-),女,山西平遥人,在读硕士研究生,主要研究方向为蛋白质化学与工程;黄登宇,男,通信作者,副教授,博士, Tel: 0351-7235535, E-mail: life211@sxu.edu.cn。

点^[5]。但以中华稻蝗为试验对象分离抗菌蛋白质的研究,我们经计算机联网检索和翻阅大量资料在国内外均未见报道。鉴于此,我们以中华稻蝗(*Oxya chinensis*)为材料,经诱导后对其抗菌蛋白质进行了初步分离。

1 材料

中华稻蝗(*Oxya chinensis*)采自山西省太原市晋源区水稻田;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherchia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)等,均由山西大学生命科学与技术学院微生物实验室提供;ÄKTA purifier 色谱系统,Pharmacia 公司;Sephadex G-50, Sigma 公司;高效液相色谱(HPLC)仪, Waters 公司;MALDI-TOF-MS 仪, Waters 公司;苯甲磺酰(PMSF), AMRESCO 分装。

2 方法

2.1 抑菌活性的测定

抑菌圈法^[6]测定,在涂有适量细菌的琼脂板上打孔,每孔加入适量供试品,37℃培养 1~2 d。抑菌活性用抑菌圈直径(mm)表示。

2.2 抗菌蛋白质的诱导与粗提液的制备

采回的中华稻蝗成虫在室内饲养 7 d 后,用 6 号昆虫针刺刺其腹部,适当浓度的大肠杆菌菌悬液中浸泡 10 min,24 h 后收集存活的中华稻蝗。取其前肠置于研钵中,加入 10 倍体积预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0),及酶抑制剂 PMSF 溶液,使其终浓度为 170 μg/mL,于冰浴中研磨,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于沸水浴中加热 10 min,迅速冰浴冷却后再次离心(12 000 r/min,4℃,10 min),收集上清液,冷冻干燥,-20℃保存。

2.3 抗菌蛋白质的初步分离

取上述抗菌活性组分,溶于少量 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0),上 Sephadex G-50 柱,用相同缓冲液洗脱,分部收集,经 280 nm 比色和抑菌活性检测,收集有抑菌活性的蛋白质峰。

2.4 HPLC 分析

取抑菌活性最高的组分,再经 HPLC 分析。HPLC 柱为 TSK C2000 SW,(7.5 mm ×30 cm),流动相为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6.0),流速为 0.6 mL/min,检测波长为 280 nm。

2.5 质谱(MS)分析

采用 MALDI-TOF MS 仪,以 70%乙腈溶液为溶剂。

3 结果

3.1 抗菌蛋白质的抑菌活性

抑菌结果显示,中华稻蝗前肠粗提液对大肠杆菌没有明显的抑制作用,对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抗菌活性。结果见表 1。

表 1 抗菌蛋白质对不同细菌的抗菌活性

Tab 1 Antibacterial activity of antibacterial protein on different bacteria

菌种	G ⁺ /G ⁻	抗菌活性 ¹
大肠埃希菌	G ⁻	-
金黄色葡萄球菌	G ⁺	+++
枯草芽孢杆菌	G ⁺	++
藤黄微球菌	G ⁺	+

¹ 抗菌活性用抑菌圈直径表示; - . 无活性; + . 1.0~5.0 mm; ++ . 5.0~10.0 mm; +++ . 10.0~15.0 mm

¹Antibacterial activity was measured by the diameter of inhibiting ring (mm); - . No antibacterial activity; + . 1.0 - 5.0 mm; ++ . 5.0 - 10.0 mm; +++ . 10.0 - 15.0 mm

3.2 抗菌蛋白质的初步分离

将经过冷冻干燥浓缩的抗菌蛋白质粗提液进行 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱,粗提液中的组分根据 M_r 大小得到初步分离,测定 280 nm 波长处的吸光度,被分出 5 个蛋白质峰。将各管物质冷冻干燥浓缩并进行抑菌活性检测,结果如图 1 所示。具有抑菌活性的成分分布在峰 2,3,4 中。经比活性测定显示峰 4 的抑菌活性最强。

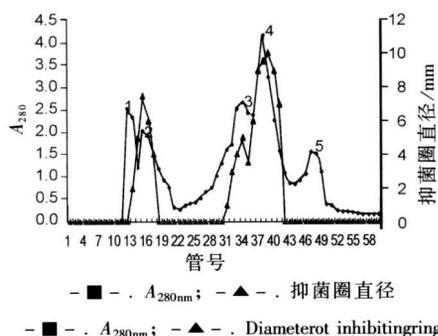


图 1 抗菌蛋白质 Sephadex G-50 洗脱曲线及其抗菌活性

Fig 1 Antibacterial protein elution profile by Sephadex G-50 chromatography and its antibacterial activity

3.3 HPLC 分析

合并峰 4 冷冻干燥浓缩后,进行 HPLC 分析。以未经诱导的中华稻蝗前肠提取液作为对照品。结果见表 2。保留时间为 18.0 min 峰的相对面积百分比在对照品中为 32.35%,而在诱导供试品中则为 47.75%,并且诱导样中多了 1 个保留时间为 17.3 min 的峰,这二者可能是造成粗提液经 Sephadex G-50 柱色谱后峰 4 峰高发生显著变化的原因。由此

表 2 对照品与抗菌蛋白质的 HPLC 分析

Tab 2 Comparison of control sample and antibacterial protein analyzed by HPLC

	序号	保留时间/min	相对面积	相对面积百分比	峰高	峰高百分比
对照品	1	15.574	547 045	24.50	8 336	18.30
	2	16.294	481 419	21.56	11 574	25.40
	3	16.816	482 013	21.59	9 786	21.48
	4	18.039	722 280	32.35	15 867	34.82
抗菌蛋白质	1	15.674	637 836	16.58	11 353	11.18
	2	16.102	681 749	17.72	19 206	18.91
	3	16.604	478 610	12.44	14 056	13.84
	4	17.299	212 621	5.53	11 075	10.90
	5	17.932	1 837 337	47.75	45 873	45.17

可以推断出这 2 个峰是抑菌成分所在。

3.4 质谱分析

中华稻蝗成虫抗菌蛋白质的质谱分析结果如图 2 所示。可以看出,前 3 个峰较显著, M_r 分别是 3 529, 3 593, 3 648。但三者的 M_r 相差不到 1 个氨基酸,推测它们可能是同 1 种抗菌蛋白质,只是被羟基化或酰基化, M_r 为 3 600 左右。

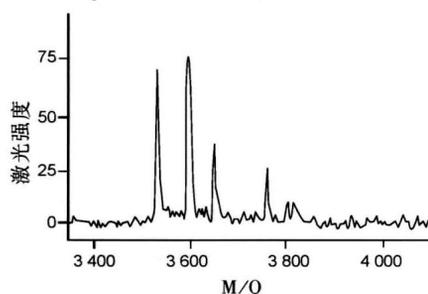


图 2 抗菌蛋白质 MS 分析

Fig 2 Antibacterial protein analyzed by MS

4 讨论

一般认为昆虫的体液免疫为“非专一性”的,不同的诱导源作用后,都能在昆虫血淋巴中检测到相似的抗菌肽^[7]。但在本实验中我们从中华稻蝗中取出的血淋巴没有抑菌效果,而在其前肠的提取物中检测到有抑菌物质的存在。Lemos^[8]报道家蝇幼虫排泄物中杀菌酶由中肠分泌,我们所提取得中华稻蝗抗菌蛋白质可能是由中华稻蝗前肠分泌物产生,也可能来源于血淋巴中的抗菌肽前体,其原因正在进行进一步的研究。

不同的抗菌蛋白质对革兰阳性菌和阴性菌的作用有所不同,中华稻蝗成虫抗菌蛋白质对实验所用的革兰阳性菌(*S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*)有广泛的抗性,但对革兰阴性菌(*E. coli*)没

有效果。

本实验中,粗提液通过 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶色谱,得到 3 个具有抑菌活性的峰,说明中华稻蝗经诱导可能产生了不同的抗菌蛋白质。本文只选取抑菌活性最强的 4 号峰进行 HPLC 分析和质谱分析,结果表明,中华稻蝗经诱导可能产生了 1 种 M_r 为 3 600 左右的抗菌蛋白质。该抗菌蛋白质的进一步分离纯化,其理化性质、氨基酸序列测定、属于昆虫抗菌肽的那一类,其抗菌作用特点以及另外 2 个峰的抗菌活性物质我们正在进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] 顾莉娟,吴健伟,苏晓庆,等. 抗菌肽的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(6): 383-386.
- [2] Masschalck B, Van Houdt R, Michiels C W. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin and nisin [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 64(3): 325-332.
- [3] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immuned pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106(1): 7-16.
- [4] Lamberty M, Zachary D, Lanot R, et al. Insect immunity constitutive expression of a cysteine rich antifungal and alinear antibacterial peptide in a termite insect [J]. J Biol Chem, 2001, 276(6): 4085-4092.
- [5] 庞凌云, 段玉峰, 陈锦屏, 等. 蝗虫的功能成分与开发前景[J]. 经济动物学报, 2004, 8(1): 54-57.
- [6] Pattnaik P. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo [J]. J Appl Microbiol, 2001, 91(4): 636-642.
- [7] Gong Xia, Shi Yonghui, Le Guowei. Purification of antimicrobial peptide MDL-1 from *Musca domestica* larvae and its effect on *Escherichia coli* ultrastructure [J]. Acta Entomologica Sinica, 2004, 47(1): 8-13.
- [8] Lemos F J A. Bacteria digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification properties and secretory mechanism [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1993, 23(4): 533-541.