

文章编号:1673-1689(2006)03-0041-05

不同微生物诱导家蝇幼虫表达抗菌肽的特性

翟培³, 侯丽霞³, 乐国伟^{1,2}, 施用晖^{*2,3}, 韩晋辉³, 代卉³

(1. 江南大学 教育部食品科学与安全重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036; 3. 江南大学 食品学院食品营养与安全研究所, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究不同微生物诱导家蝇幼虫表达的抗菌肽特性。用 3 种不同的病原菌通过针刺感染的方法诱导家蝇幼虫表达抗菌肽, 通过 Sephadex G25 分离, 用 Hult mark 改进法和抑菌圈测定法作抑菌试验, 用毛细管电泳(CE)分析不同微生物诱导得到的抗菌肽样品差异, 检测抗菌肽的热稳定性和酸碱耐受性。发现不同微生物诱导产生的家蝇抗菌肽具有广谱抑菌性, 但不同样品对不同病原菌抑菌活性有差异, 不同测定抑菌效果的方法对抑菌结果有影响, 各种抗菌肽样品 CE 蛋白谱具有明显不同。抗菌肽样品都具有热稳定性和酸碱耐受性。说明不同微生物诱导产生的家蝇抗菌肽类型以及抗菌肽含量与诱导源有关, 抗菌肽为家蝇幼虫体内固有成分, 诱导增加了抗菌肽的表达量同时刺激新抗菌肽的产生。用志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌诱导家蝇幼虫可产生较多含量高活性好的抗菌肽。

关键词: 家蝇幼虫抗菌肽; 抗菌活性; CE 蛋白谱; 热稳定性; 酸碱耐受性

中图分类号: Q 514. 3

文献标识码: A

The Characteristics of the Antibacterial Peptides of *Musca domestica* Larvae Induced by Varies Microorganisms

ZHAI Pei³, HOU Li-xia³, LE Guo-wei^{1,2}, SHI Yong-hui^{*2,3}, HAI Jin-hui³, DAI Hui³

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industry, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. Institutite of Food Nutrition and Safety, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This study investigated the characteristics of the antibacterial peptides of *Musca domestica* larvae that were induced by varies microorganisms. The antibacterial peptides of *Musca Domestica larvae* were induced by injection with three bacteria. We uses Sephadex G25 to isolate and then use the improvement method of Hult Mark and inhibition zone assay to investigate antibacterial activity of the antibacterial peptides. Capillary electrophoresis (CE) was used to analyze the differences of the peptides. We also tested the antibacterial peptides' heat stability and tolerance of pH. It was found that the antibacterial peptides induced by varies microorganisms had broad-spectrum antibacterial activity but the antibacterial activity were different in each

收稿日期: 2005-05-11; 修回日期: 2005-10-11.

基金项目: 中央级科研院所基础性工作专项项目(2001DEA20022).

作者简介: 翟培(1980-), 女, 新疆人, 动物营养与饲料科学硕士研究生; * 通讯作者.

cases. Different methods would influence the antibacterial activity results. The proteinograms obtained from CE were different with each other. All of the antibacterial peptides had heat stability and tolerance of pH. These results indicated that the antibacterial peptides' expression was related with the agents of induction. The antibacterial peptides existed in *Musca Domestica larvae* body originally. Induction increased the content of the antibacterial peptides and stimulated the formation of new antibacterial peptides. It was found that the antibacterial peptides induced by *Shigella*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were of high contents and activity.

Key words: antibacterial peptides of *Musca domestica* larvae; antibacterial activity; proteinogram; heat stability; tolerance of pH

抗菌肽(antimicrobial peptides)是具有抗菌活性短肽的总称。随着细菌抗药性的增强,抗菌肽被认为是一类具有巨大发展潜力的新型抗菌药物和天然食品防腐剂。昆虫抗菌肽具有相对分子质量低、热稳定和广谱高效抗菌活性,而且不同于现有的抗生素的抗菌机理,已成为昆虫学、生理学及药理学等生命科学研究的热点^[1-2]。家蝇表现出极强的适应恶劣环境的能力,对其免疫防御体系的研究具有理论意义和应用价值,因而家蝇抗菌肽开始受到关注^[3]。

家蝇不存在像高等动物那样的记忆免疫(如B和T-细胞),故当遭受微生物等因素侵染时,会在血淋巴中产生抗菌肽以进行防御^[4]。宫霞^[5]利用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导家蝇幼虫得到了3种具有不同相对分子质量和活性的抗菌肽。柏鸣^[6]用枯草杆菌诱导家蝇幼虫得到了一种相对分子质量为 12.6×10^3 的抗菌肽。陈留存^[7]用大肠杆菌诱导得到了一种相对分子质量为 10×10^3 的抗菌肽。从这里我们发现不同的微生物诱导源诱导家蝇幼虫会产生不同的抗菌肽。同时报道中分别用电泳和离子交换层析等分离原理不同的方法对同一种微生物诱导的家蝇血淋巴进行分离,结果却得到不同的几种抗菌肽。国内外对于家蝇通过不同微生物诱导源产生不同抗菌肽尚没有很深入的研究,本实验用3种病源菌诱导家蝇幼虫产生抗菌肽,通过Sephadex G25以及毛细管电泳对不同诱导源诱导产生的抗菌肽进行分离分析,并对抗菌肽的特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 家蝇幼虫

三龄幼虫:无锡昆龙生态生物环保有限公司提供。 万方数据

1.2 菌种

用于诱导的病源菌有:志贺氏菌 51302 (*Shigella*51302)、鼠伤寒沙门氏菌 50013 (*Salmonella typhimurium*50013)、金黄色葡萄球菌 6538 (*Staphylococcus aureus*6538)

用于抑菌实验的菌种除了三种诱导菌之外还包括:大肠杆菌 ATCC25922 (*Ecoli*ATCC25922)、绿脓杆菌 (*Aeruginosus bacillus*)、枯草杆菌 9372 (*Bacillus subtilis*9372)、链球菌(*Chain coccus*)。

1.3 实验方法

1.3.1 抗菌肽的诱导 三龄家蝇幼虫用3种病源菌分别进行诱导。将沾有细菌菌液的钢刷刺伤家蝇三龄幼虫,刺伤后于饲养盘在25℃继续培养24h,保证饲养环境的通气和湿润,在同样的饲养条件下设立对照组。然后,收集虫体,立即分组标记放入液氮中速冻。

1.3.2 抗菌肽的提取 将一定量虫体放入高速匀浆机中,按重量/体积比为1/3加入提取液(0.05 mol/L 乙酸铵缓冲液 pH 5.0, 35 μg/mL 苯甲基磺酰氟 PMSF, 2% (w/v) 巯基乙醇),充分匀浆后,用400目纱网过滤,滤液用4℃ 12 000 r/min 高速冷冻离心30 min,取上清,沉淀再用0.05 mol/L 乙酸铵缓冲液 pH 5.0 浸泡后冷冻离心,重复三次,合并上清;将上清液于沸水浴中搅拌加热5 min,迅速在冰浴中冷却后,经4 800 r/min 离心30 min 除去变性蛋白,沉淀再用少量蒸馏水洗涤两次,以同样转速离心30 min,合并3次上清液。

样品用0.05 mol/L 乙酸铵为缓冲液, Sephadex G25 分离,分别收集有效峰,真空冷冻干燥成粉末, -70℃ 深度冷冻冰箱保存待用。

1.3.3 抗菌活性和抗菌谱检测 Hult mark 改进法^[3]:培养菌至对数期,6 000 r/min 离心10 min 沉淀菌体,倒去培养基,再用灭菌的PBS缓冲液(pH

7.4)清洗菌体一次,6 000 r/min 离心 10 min 倒去上清,用培养基分别配制细菌的菌悬液,630 nm 测得终浑浊度 $A=0.2\sim 0.3$,以 2 mL 菌悬液中加入 10 μL 抗菌肽(对照 A_0 为加入 10 μL 培养基),37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h 后立即转入冰浴,20 min 后在 630 nm 测量吸光度 A 的变化。抗菌活力按 $U = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}}$ 式计算, A_0 为对照的吸光度。

抑菌圈测定法:培养菌至对数期,6 000 r/min 离心 10 min 沉淀菌体,倒去培养基,再用灭菌的 PBS 缓冲液(pH 7.4)清洗菌体一次,6 000 r/min 离心 10 min 倒去上清,用 PBS 缓冲液(pH 7.4)分别配制细菌的菌悬液,在肉汤平板培养基上加入 0.5 mL 菌悬液,铺平,将已灭菌的滤纸片($d=5$ mm)贴在培养基表面,上加 5 μL 浓度为 10 mg/mL 的样品,设立灭菌水对照以及未经诱导的样品对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,测定抑菌圈直径以表示抑菌活力。

1.3.4 毛细管电泳分析 每次进样前用 0.1 mol/L 的 HCL 及缓冲液冲洗毛细管各 5 min。运行电压 150V,负压进样(66.7 KPa),进样时间 1 s,测定温度 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 230 nm。

电泳液为 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),电泳前新鲜配制,45 μm 滤膜过滤,超声波清洗仪中脱气 30 min。

1.3.5 抗菌肽样品热稳定性检测 将家蝇抗菌肽样品溶于双蒸水后分别置 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中分别煮沸不同时间,以及在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反复冻溶,分别进行抑菌活性测定。

1.3.6 抗菌肽酸碱耐受性检测 将家蝇抗菌肽样品溶于双蒸水后用乙酸氨水缓冲液分别调不同

pH,测定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 不同微生物诱导家蝇幼虫表达抗菌肽的抗菌活性与抗菌谱

由表 1、表 2 可知不同微生物诱导表达的家蝇抗菌肽对多种菌都有抑制作用,但抗菌活性各不相同。3 种不同微生物诱导表达的样品对各自的诱导菌种的活性都较强。对于多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都出现较好的抗菌活性。

Hult mark 改进法是测定样品在液体培养基内短时间(1 h)对不同病菌的抗菌活性,抑菌圈测定法则是样品和病菌在琼脂培养基上共同培养 24 h 后测定抑菌圈大小来表示抗菌活性。Hult mark 改进法和抑菌圈测定法得到的结果相比,可能因为培养条件和培养环境的影响所得抗菌肽样品的抗菌谱以及抑菌活性有所不同。

2.2 毛细管电泳分析

由毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)所得抗菌肽蛋白谱(见图 1~4)可知经 Sephadex G25 初步提纯的家蝇抗菌肽提取液成分比较复杂,家蝇幼虫抗菌肽提取液诱导前后吸收峰变化明显, AU 吸收值变化很大。在未诱导的对照样品的蛋白谱图中保留时间分别为 5、8、14、19 min 时出现了峰面积较大的几个吸收峰,3 种诱导产生的抗菌肽蛋白谱中在相似的保留时间内都出现较大的吸收峰,而且峰高峰面积较对照样品增大较多甚至增大一个数量级,同时 3 种样品蛋白谱都出现比对照样品更多且峰面积较大得吸收峰,而且出现多个具有相同保留时间的吸收峰。不同菌种诱导的样品相互之间其蛋白谱在峰面积以及峰的数量上也有很大差异。

表 1 Hult mark 改进法测定抑菌活性结果(U)

Tab. 1 The result of antibacterial activity by improvement method of Hult Mark (U)

抗菌肽样品	病原菌						
	<i>Ecoli</i>	志贺氏菌	沙门氏菌	枯草杆菌	金黄色葡萄球菌	链球菌	绿脓杆菌
志贺菌诱导表达样品	—	0.575	—	0.420	—	0.200	—
鼠伤寒沙门氏菌诱导表达样品	—	0.237	0.324	0.221	0.263	0.274	—
金黄色葡萄球菌诱导表达样品	0.045	0.105	—	0.293	0.126	0.237	0.110
未经诱导的对照 CK	—	0.286	—	0.219	—	0.126	—

注:—为没有抑菌效

万方数据

表2 抑菌圈测定法结果(mm)

Tab. 2 The result of inhibition zone assay(mm)

抗菌肽样品	病原菌						
	<i>E. coli</i>	志贺氏菌	沙门氏菌	枯草杆菌	金黄色葡萄球菌	链球菌	绿脓杆菌
志贺菌诱导表达样品	8	10	8	10	9.5	7	6.5
鼠伤寒沙门氏菌诱导表达样品	10	9	10	9	8.5	10	6
金黄色葡萄球菌诱导表达样品	6.5	9	6	10.5	10	8.5	6
未经诱导的对照 CK	6.5	7.5	6	7.5	8	—	6

注:—为没有抑菌效果

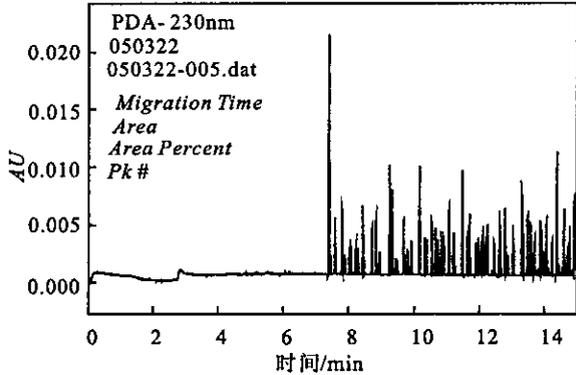


图1 金黄色葡萄球菌诱导表达样

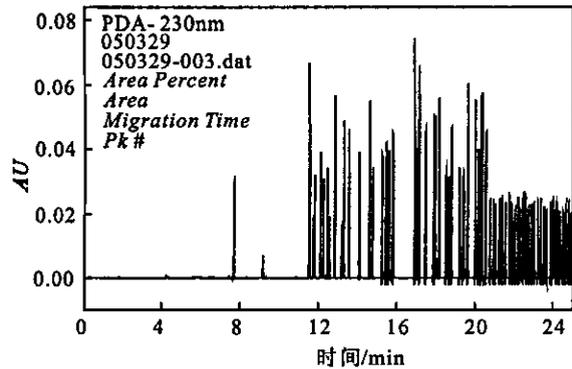
Fig. 1 CE proteinogram of sample induced by *Staphylococcus aureus*

图2 志贺氏菌诱导表达样品 CE 蛋白谱

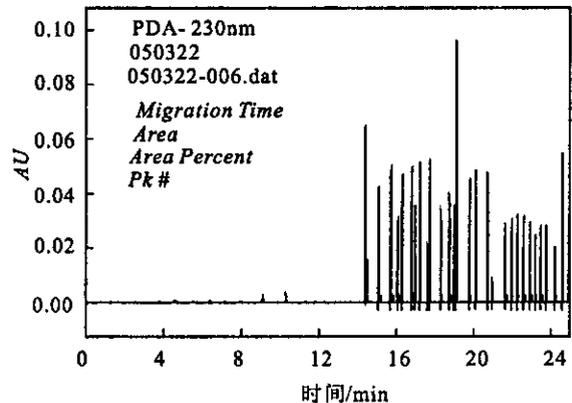
Fig. 2 CE proteinogram of sample induced by *Shigella*

图3 鼠伤寒沙门氏菌诱导表达样品 CE 蛋白谱

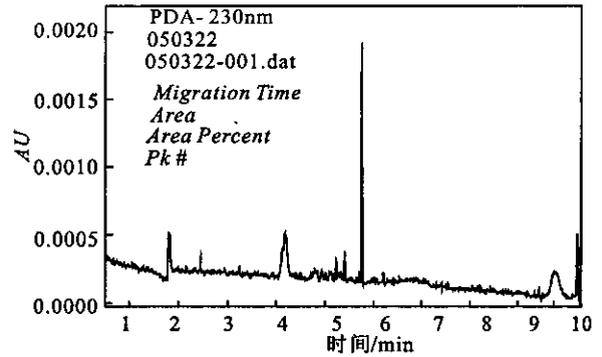
Fig. 3 CE proteinogram of sample induced by *Salmonella typhimurium*

图4 对照样品的 CE 蛋白谱

Fig. 4 CE proteinogram of CK sample

2.3 抗菌肽热稳定性

实验表明样品在沸水中煮沸 5~30 min, 对样品的抗菌活性影响不大; 样品在 -20 °C 冰箱中反复冻溶数次, 其抗菌活性依然保持。说明样品受温度影响不大, 具有很好的热稳定性。

2.4 抗菌肽酸碱耐受性

实验表明(见图 5)不同的抗菌肽样品基本上从 pH 5 开始, 随着 pH 的增加, 抗菌活性稍有提高, 到 pH 8~9 左右抗菌活性最大, 当 pH 低于 5 时, 不同样品的抗菌活性变化不大。据报道, 多数昆虫抗菌肽是碱性的, 其等电点应该大于 7.0^[8], 本实验结果表明, 不同微生物诱导家蝇幼虫表达的抗菌肽应都呈弱碱性。

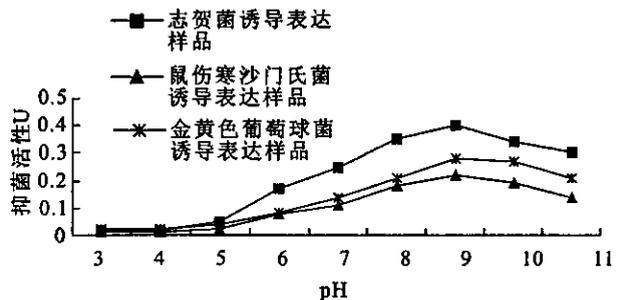


图5 3种抗菌肽样品酸碱耐受性实验结果

Fig. 5 The essay's result of pH tolerance of three antibacterial peptides

3 结 论

由昆虫抗菌肽的各种优点,可以预测,作为新型天然防腐剂及新型药物,昆虫抗菌肽将在农业、食品业、工业、卫生用品和临床医学等方面发挥重要作用。家蝇抗菌肽作为昆虫抗菌肽中比较重要的一部分也将受到各个行业的重视。本文首次较详细的探讨了不同微生物诱导产生家蝇抗菌肽之间的差异,为家蝇抗菌肽的深入研究开辟了道路。

本研究利用生物因子—3种不同的病原菌针刺感染家蝇幼虫进行诱导,得到3种不同而且抑菌效果都较好的抗菌肽样品。3种抗菌肽样品具有抗菌谱广,抑菌活性好的优点,抑菌效果优于未经诱导的样品,但对于各种病原菌抑菌活性相互之间存在差异。推测原因是:经过诱导,3种样品中抗菌肽含量都大幅度增加而且不同的诱导源造成样品中的抗菌肽类型以及含量有差异。通过对两种测定抗菌肽抑菌效果的方法进行对比,我们发现不同的测定方法对抗菌肽的抑菌活性和抑菌谱的结果是有影响的,不同样品对于不同微生物的抑制作用因测定环境(固体培养和液体培养)不同和测定时间长短以及抗菌肽的用量而有所差别的。

通过对初步纯化的样品进行毛细管电泳(CE)分析,我们证实了在抑菌实验中的推测:针刺感染诱导使家蝇幼虫体内与对照相比产生了大量的抗

菌肽,而不同的病原菌诱导都会产生类型含量不完全相同的多种抗菌肽。结合抑菌实验的结果进行分析,我们发现家蝇抗菌肽应为其体内固有成分,抗菌物质的产生受其自身结构基因调控,故当家蝇幼虫受到微生物的侵染时,各种抗菌肽总是先后翻译,共同存在于血淋巴之中,菌种诱导增加了抗菌肽的产生量同时激活新抗菌肽产生,但是不同的诱导源刺激和激活的对象是有区别的。在血淋巴中的多种抗菌肽能协同表达,使得家蝇幼虫的体液抗菌谱很广,以达到成功防御的目的。

同时我们还发现用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)诱导表达的样品以及志贺氏菌(*Shigella*)诱导表达的样品的抑菌效果都较好,在毛细管电泳的蛋白图谱中出峰的峰高和峰面积也较大,这说明利用这3种菌对家蝇幼虫进行诱导可使虫体产生较多高含量高活性抗菌蛋白。

家蝇幼虫抗菌肽具有良好的热稳定性和酸碱耐受性的特性使家蝇幼虫抗菌肽将在各行业受到广泛的重视和利用。

不同诱导源诱导得到的家蝇幼虫抗菌肽样品所含有的抗菌肽类型的具体差异,昆虫抗菌肽的结构与活性之间的关系以及抗菌肽如何安全应用在医药食品中,这些问题都需要我们在对抗菌肽进一步的研究中去解决。

参考文献:

- [1] Yamakawa M. Insectantibacterial proteins: Regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics [J]. *Jseric Sci*, 1998, 67(3):163—182.
- [2] 宫霞,乐国伟,施用晖. 昆虫抗菌肽及其基因工程研究进展[J]. *遗传*, 2002, 24(5):591—594.
- [3] 饶军华,周永富,阳建春. 家蝇免疫血淋巴的性质研究[J]. *昆虫天敌*, 1999, 21(3):121—125.
- [4] 王荫长. 昆虫生物化学(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [5] 宫霞,乐国伟,施用晖. 电泳制备家蝇幼虫抗菌肽及其性质[J]. *无锡轻工大学学报:食品与生物技术*, 2003, 22(6):31—38.
- [6] 柏鸣,周立. 家蝇抗菌蛋白的分离纯化及部分性质[J]. *应用与环境生物学报* 2001, 7(6):568—571
- [7] 陈留存,王金星. 家蝇抗菌肽的分离纯化及性质研究[J]. *山东大学学报:自然科学版*, 2001, 36(2):351—357.
- [8] Hancock R, Lehrer R. Cationic peptides: A new source of antibiotics[J]. *Trends Biotechnol*, 1998;16:82—8.

(责任编辑:杨 萌)