

鸡白细胞中抗菌肽的分离纯化 及活性鉴定方法的建立

齐珂珂^{1,2}, 康相涛^{1,3}, 李国喜¹, 孙桂荣¹, 田亚东¹, 韩瑞丽¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;
3 河南家禽种质资源创新研究工程中心, 河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**建立鸡白细胞中抗菌肽的分离纯化及活性鉴定方法。**【方法】**通过腹腔注射酪蛋白生理盐水,从鸡人工腹水中得到白细胞;将收集的白细胞,通过超声波反复破碎、体积分数 10% 乙酸浸提、低温高速离心、旋转蒸发除去乙酸和冷冻干燥等方法,得到抗菌肽粗提物;将得到的粗提物,经 CM-Sepharose Fast Flow 弱酸性阳离子交换层析和反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化,收集分离的各组分,使用微量琼脂糖扩散法检测各组分的抗菌活性和最小抑菌浓度。**【结果】**共获得鸡抗菌肽粗提物 0.270 g,经 RP-HPLC 分离纯化,抗菌肽离子交换阳性组分共分离出 18 个峰,其中 6 个峰对 3 种细菌均表现较强的抑菌活性,对鸡大肠杆菌 *E. coli* O78(峰 13)、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 1056MRSA(峰 15)和白色念珠菌 *C. albicans* ATCC10231(峰 15)的最小抑菌浓度分别为 0.627, 0.001 和 0.035 $\mu\text{g/mL}$ 。**【结论】**该法可以在实验室中用于鸡抗菌肽的提取及活性鉴定。

[关键词] 鸡白细胞;抗菌肽;纯化;活性检测

[中图分类号] Q516 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)09-0027-06

Establishment of isolation, purification and activity identification method of chicken leucocyte antimicrobial peptides

QI Ke-ke^{1,2}, KANG Xiang-tao^{1,3}, LI Guo-xi¹, SUN Gui-rong¹, TIAN Ya-dong¹, HAN Rui-li¹

(1 Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou, Henan 450002, China;
2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100094, China; 3 The Research Center of Breeding
Resources for Poultry in Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to establish isolation, purification and activity identification method of chicken leucocyte antimicrobial peptides. **【Method】** Sterile peritoneal exudates were harvested from chicken after injecting saline with starch, then the white blood cells were collected. The white blood cells were sonicated to release the neutrophil granules. These granules were suspended in acetic acid and mixed overnight to extract the antimicrobial peptides. Ion-exchange chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) were used to separate the components present in the crude extract. Antimicrobial activity and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the radial diffusion plate assay method. **【Result】** 0.270 g chicken crude extract was obtained. Using RP-HPLC the components in the active cationic fraction were separated into 18 peaks; peak 8 had good activity against all three test organisms; the minimum inhibitory concentrations of peak 13 against chicken

* **[收稿日期]** 2007-09-30
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BDA01A09);公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-039);河南省杰出人才创新基金项目(074200510009)
[作者简介] 齐珂珂(1981—),女,河南偃师人,在读博士,主要从事家禽动物营养研究。E-mail:kergh2006@yahoo.com.cn
[通讯作者] 康相涛(1962—),男,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事家禽遗传育种研究。E-mail:xtkang2001@263.net

E. coli O78, peak 15 against *S. aureus* 1056MRSA and peak 15 against *C. albicans* ATCC10231 was 0.627, 0.001 and 0.035 $\mu\text{g/mL}$ respectively. 【Conclusion】 This method could be widely used to purify chicken antimicrobial peptides and identify antimicrobial activity in laboratory.

Key words: chicken leucocyte; antimicrobial peptide; purification; activity identification

抗菌肽又称抗微生物肽(antimicrobial peptide)或肽抗生素(peptide antibiotics),是广泛存在于动物、植物和微生物中的一大群结构和化学性质各异,具有抗微生物活性的蛋白质和多肽的统称,是天然免疫防御系统的一部分^[1-2]。

多肽分离技术种类繁多^[3-9],传统的分离技术主要是利用多肽物理和化学性质的差异,即以分子的大小、形状、等电点、溶解度、疏水性以及与其他分子的亲合性等性质建立起来的。近年来,多肽的分离纯化技术有了很大发展,主要是依靠层析和电泳技术。然而在实际应用过程中,由于多肽在动物的组织和细胞中含量少,且多以复杂混合物的形式存在,因此到目前为止,还没有一个单独或一整套现成的方法可以将任何一种多肽从复杂的混合物中分离出来,只能依据目的多肽的物理和化学性质摸索和选择一套适当的分离程序,获得较高纯度的制品。

动物抗菌肽在白细胞中的颗粒细胞胞浆颗粒中含量较多,其相对分子质量小(约 4 ku),在组织中的含量很低,且作为一种活性成分,易受多种因素的影响而失活,因而其分离纯化比较困难。关于抗菌肽的分离纯化技术,目前尚无统一的方法。同时,由于多数抗菌肽分子在体内的含量少,难以获得大量的样品。因此,建立微量而敏感的抑菌试验方法在内源性抗菌分子的研究中也极为重要。为此,本研究在前人研究的基础上,结合本课题的实验条件,探索了一种较为可行的鸡抗菌肽提取纯化及活性鉴定方法,以期抗菌肽的提取纯化及应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 成年丝毛乌骨鸡 30 只,公母各半,购自河南农业大学畜牧站种鸡场。

1.1.2 供试菌种 鸡大肠杆菌 *E. coli* O78 株由河南农业大学牧医工程学院微生物教研室提供;金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 1056MRSA、白色念珠菌 *C. albicans* ATCC10231,均购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 主要仪器 低温高速冷冻离心机(Sigma)、超声波破碎机(Sonics VC130)、冻干机(CHRIST)、旋转蒸发仪(BUCHI)、离子交换柱(填料为 Phar-

macia 公司的 CM-Sepharose Fast Flow)、Elite P230 高效液相色谱仪、Hypersil ODS2 C18 柱(Elite, 4.6 mm $\times$ 250 mm)等。

1.1.4 主要试剂的配制 PBSX 液:氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,含 6 分子水的氯化镁 0.1 g,磷酸氢二钠 1.15 g,磷酸二氢钾 0.2 g,加蒸馏水至 1 L。

TSB 培养液:将胰蛋白胨大豆肉汤培养基 30 g 溶解到 1 L 蒸馏水中,用 125 mL 的三角瓶分装,121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温灭菌 20 min,室温保存。

底层琼脂:将 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 50 mL 和 5 mL TSB 培养液混合后,加 5 g 琼脂糖,加蒸馏水至 500 mL,用 NaOH 或 HCl 调 pH 值至 7.4,加热溶解,分装成 50 mL/瓶,121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温灭菌 20 min,室温保存。使用前 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。

顶层琼脂:60 g 胰蛋白胨大豆肉汤汤粉和 10 g 琼脂糖,加蒸馏水至 1 L,加热溶解,分装成 50 mL/瓶,121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温灭菌 20 min,室温保存。使用前 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡白细胞的采集 每只鸡腹腔内注入 0.5 g/L 酪蛋白生理盐水 200 mL,6~8 h 后,放血处死,收集富含白细胞的腹水,肝素抗凝。经 6 层纱布过滤除去杂质,2 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,收集白细胞,PBSX 液洗涤 2 次后,用冷却的去离子水裂解残留红细胞,镜检,至无红细胞为止。

1.2.2 鸡抗菌肽粗提物的制备 向采集的鸡白细胞中加入等渗盐水,60 Hz 超声波破碎细胞 4 $\times$ 60 s 后,镜检,至约 95% 的白细胞破碎为止。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 40 min,沉淀物即为白细胞胞浆内的颗粒组分。将获得的颗粒组分置入体积分数 10% 乙酸中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,置于圆底烧瓶中,旋转蒸发仪除去乙酸后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,冷冻干燥,即为鸡白细胞抗菌肽粗提物。

1.2.3 鸡抗菌肽活性的测定 参照 Lehrer 等^[10]的方法进行。取制备的鸡抗菌肽粗提物溶于体积分数 0.01% 乙酸溶液中,在直径 9 cm 的平皿内倒 10 mL 底层琼脂以及调整好浓度的处于对数生长期的细菌,使琼脂内的细菌终浓度为 10⁶ cfu/mL,调整

pH 为 7.4,待琼脂冷却后,在底层琼脂上打直径 3 mm 的孔,每孔加入 5 μ L 样品,阴性对照孔加 5 μ L 体积分数 0.01%乙酸,将平皿倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内,3 h 后在底层琼脂上覆盖一层顶层琼脂,37 $^{\circ}$ C 过夜孵育,用游标卡尺测量抗菌环直径。

1.2.4 鸡抗菌肽粗提物的离子交换层析纯化^[11]

取弱酸性阳离子交换树脂 CM-Sepharose Fast Flow,加入 25 mmol/L、pH5.4 的醋酸铵缓冲液,置于抽气瓶中除去气泡,待用。选用 2.0 cm $\times$ 40 cm 的柱子,将柱子洗涤干净,关闭层析柱的出水口,装入 1/3 柱高的缓冲液,将处理好的填料用胶头滴管缓慢加入柱中,使凝胶均匀沉降。在装柱过程中,不能干柱、分层,否则必须重新装柱。柱子装好后,用醋酸铵缓冲液在恒定压力下平衡柱子 2 h 以上,然后关闭出水口,将上述鸡抗菌肽粗提物 5.0 mL 缓慢上样于离子交换柱中,加样时应小心缓慢地将样品加到凝胶表面,尽量避免冲击凝胶,以保持凝胶表面平坦。待记录仪基线走平,然后用体积分数 10%乙酸、pH3.8 进行洗脱,流速为 1.2 mL/min,紫外检测仪检测其 280 nm 处的吸光值,按峰收集洗脱液。将收集的洗脱液冻干,溶于体积分数 0.01%乙酸中,以微量琼脂糖扩散法检测各峰对鸡大肠杆菌 *E. coli* O78 的抗菌效果。收集有抗菌活性的组分,冻干,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 紫外吸收光谱 将冻干的离子交换层析产物中的活性组分(抑菌试验检测)溶解于 1 mL 双蒸水中,以双蒸水为空白对照,用双光束紫外可见分光光度计在 200~300 nm 吸收光谱紫外扫描。

1.2.6 RP-HPLC 纯化 使用高效液相色谱仪对离子交换层析后检验有活性的产物进行进一步分离纯化。洗脱梯度系统为:A 液,体积分数 5%乙腈,含体积分数 0.1%的三氟乙酸(TFA);B 液,体积分数 95%乙腈,以 26%~35%B 液进行线性梯度洗脱,上样量为 20 μ L,流速为 0.8 mL/min,215 nm 处检测紫外吸收,按峰收集组分,用于活性检验。并把检验有活性的组分收集、冻干,即为需要的纯品,用于进一步的纯度检验和氨基酸序列测定。

1.2.7 蛋白质含量的测定 采用考马斯亮兰法(Bradford 法),以牛血清白蛋白(BSA)为标准,根据蛋白质含量和 OD₅₉₀/OD₄₅₀ 的线性关系,绘制标准曲线,然后计算样品中蛋白质含量。

1.2.8 最小抑菌浓度(MIC)的测定 参照 Steinberg 等^[12]的方法,挑单菌落接种于 5 mL TSB 培养基中,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡过夜,取 100 μ L 过夜的

菌液于 5 mL TSB 培养基,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡 4 h。用移液枪分别吸取 10 mL 底层琼脂于 6 个无菌试管中,同法分别吸取 10 mL 2 倍的顶层琼脂至 6 个无菌试管中,然后把试管放入 50 $^{\circ}$ C 水浴中(保持琼脂不凝固)。将冻干的样品溶解于体积分数为 0.5%乙酸中,用体积分数 0.5%乙酸 2 倍系列稀释样品溶液。取孵育 4 h 的菌种 100 μ L,加入 10 mL 底层琼脂中,涡旋振荡,混匀后,把混合液倾倒入 9 mL 无菌平皿中,放置 5 min,在底层琼脂上用无菌钢管打 3 mm 的孔,用无菌牙签移去孔内的琼脂,添加 5 μ L 2 倍系列稀释的样品于孔内,用体积分数 0.5%乙酸作阴性对照,37 $^{\circ}$ C 培养 3 h 后,小心倒入 2 倍的顶层琼脂,37 $^{\circ}$ C 过夜。用游标卡尺准确测量不同稀释度样品的抑菌圈直径,按下列公式计算抗菌活性单位。

抗菌活性单位=[抗菌环直径(mm)-3] $\times$ 10。

用 Excel 绘制抗菌活性单位与蛋白质浓度的曲线,所得方程式的 X 轴截距即是最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 鸡抗菌肽粗提物的获得

30 只鸡共收集腹水 1.5 L,获得约 7.5 $\times$ 10¹⁰ 个白细胞,其中约 90%以上为异嗜性粒细胞,95%以上为成活细胞,共得抗菌肽粗提物 0.270 g。

2.2 鸡抗菌肽粗提物的离子交换层析纯化结果

鸡抗菌肽粗提物离子交换层析图见图 1,其中峰 1 为 25 mmol/L 醋酸铵洗脱出的未与阳离子树脂结合的阴性组分,峰 2 为体积分数 10%乙酸从阳离子树脂上置换出的阳性组分。

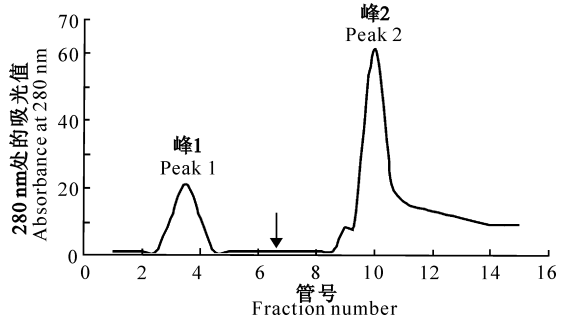


图 1 鸡抗菌肽粗提物离子交换层析图
峰 1、峰 2 分别为 25 mmol/L 醋酸铵、体积分数 10%乙酸的洗脱峰;
箭头处表示洗脱液从 25 mmol/L 醋酸铵变为体积分数 10%乙酸

Fig. 1 Cationion-exchange chromatograph
peak 1 and peak 2 of the crude extract to chicken
antimicrobial peptides; The arrow shows where the running
buffer was changed from 25 mmol/L ammonium chloride
to 10% acetic acid

鸡抗菌肽粗提物和离子交换产物峰 1、峰 2 抑 肽粗提物和离子交换产物峰 2(即阳性组分)有较强的
菌活性检测结果见表 1。由表 1 可以看出,鸡抗菌 的抑菌活性。

表 1 鸡抗菌肽粗提物和离子交换产物的抑菌圈直径

Table 1 Inhibitory bacterial zone of crude extract and ion-exchange products of antimicrobial peptides mm			
项目 Item	鸡大肠杆菌 <i>E. coli</i> O78	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1056MRSA	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> ATCC10231
粗提物 Crude extract	13.63	14.71	—
峰 2 Peak 2	14.27	16.01	16.84
峰 1 Peak 1	3.00	3.00	3.00
阴性对照 Negative control	3.00	3.00	3.00

注:“—”表示测定时数据不足。
Note:“—”denotes that the data are not sufficient.

2.3 紫外吸收光谱

离子交换层析活性产物紫外扫描光谱见图 2。由图 2 可以看出,鸡抗菌肽粗提物离子交换产物在 200~300 nm 有 2 个吸收峰,其中最大的吸收峰在 210 nm 左右,还有一个较小的吸收峰在 280 nm 左右。从紫外吸收光谱可以看到,鸡抗菌肽不只表现了蛋白质的特征性吸收,而且提供了该物质氨基酸组成方面的信息。

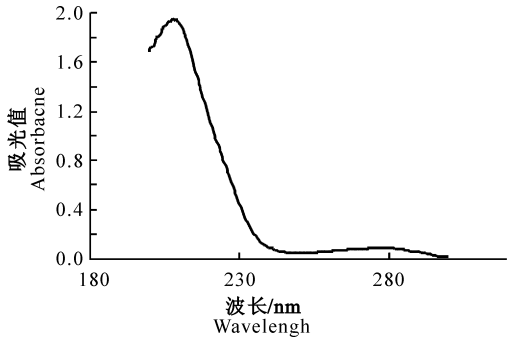


图 2 鸡抗菌肽粗提物离子交换产物在 200~300 nm 的紫外吸收光谱

Fig. 2 Absorption at 200—300 nm wavelength of ion-exchange products of antimicrobial peptides

2.4 RP-HPLC 纯化

鸡抗菌肽粗提物离子交换层析的 RP-HPLC 分离效果图见图 3。由图 3 可以看出,鸡抗菌肽粗提物离子交换产物共分离出 18 个峰,其中峰 4、峰 6、峰 8、峰 9、峰 11、峰 12、峰 13、峰 14、峰 15 有不同强度的抑菌活性,活性检验结果见表 2。

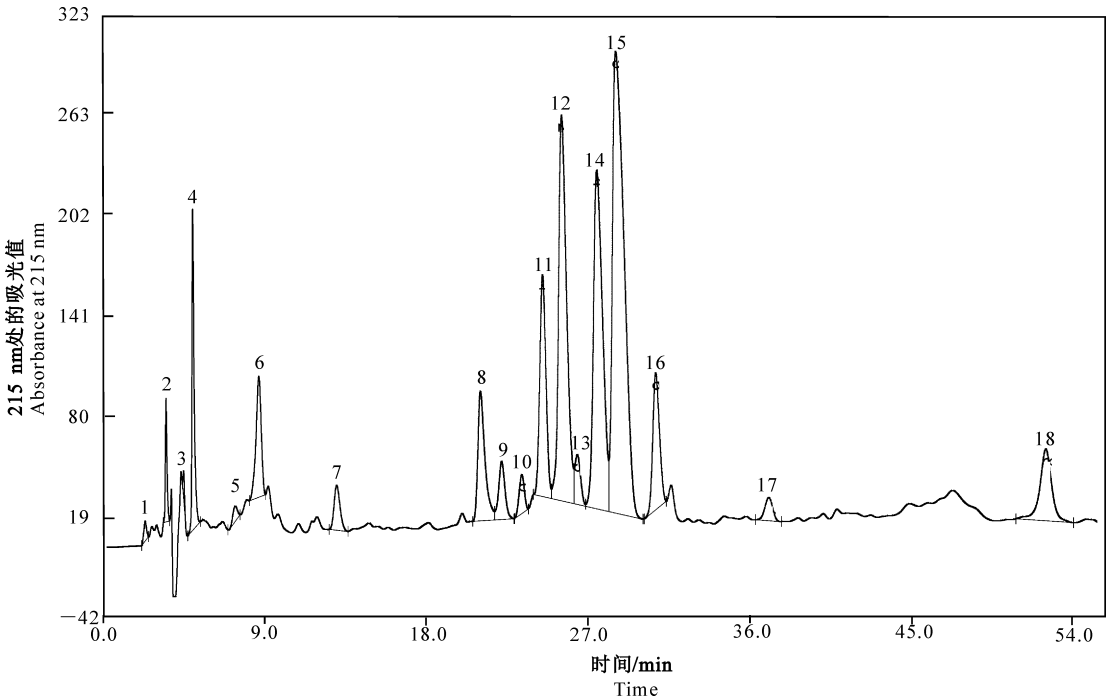


图 3 鸡抗菌肽粗提物离子交换层析活性峰峰 2 的 RP-HPLC 分离效果图

Fig. 3 RP-HPLC chromatograph of the cationic fraction of ion-exchange products of antimicrobial peptides

表 2 鸡抗菌肽粗提物离子交换层析阳性产物 RP-HPLC 分离各峰的抑菌效果

Table 2 Antimicrobial activity of RP-HPLC purified the cationic fraction from ion-exchangde productsof antimicrobial peptides

波峰 Peak	鸡大肠杆菌 <i>E. coli</i> O78	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1056MRSA	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> ATCC10231	波峰 Peak	鸡大肠杆菌 <i>E. coli</i> O78	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1056MRSA	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> ATCC10231
峰 4 Peak 4	+	+	—	峰 12 Peak 12	++	++	++
峰 6 Peak 6	++	++	+++	峰 13 Peak 13	+++	++	—
峰 8 Peak 8	++	++	—	峰 14 Peak 14	+	+	+
峰 9 Peak 9	+	+	—	峰 15 Peak 15	++	+++	++
峰 11 Peak 11	++	++	++				

注:++++表示抑菌圈直径在 12.0 mm 以上;+++表示抑菌圈直径为 9.0~12.0 mm;++表示抑菌圈直径为 6.0~9.0 mm;+表示抑菌圈直径为 3.0~6.0 mm;—表示抑菌圈直径在 3.0 mm 以下。

Note:++++denotes the diameter of the inhibition zone beyond 12.0 mm;+++denotes the diameter of the inhibition zone from 9.0 to 12.0 mm;++denotes the diameter of inhibition zone from 6.0 to 9.0 mm;+ denoteds the diameter of inhibition zone from 3.0 to 6.0 mm;—denotes the diameter of the inhibition zaone under 3.0 mm

挑选抗菌活性较强的 6 个峰,即峰 6、峰 8、峰 11、峰 12、峰 13 和峰 15,以鸡大肠杆菌 *E. coli* O78、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 1056MRSA 和白色念珠菌 *C. albicans* ATCC10231 为试验菌种,进行 MIC 的测定,结果见表 3。

表 3 鸡抗菌肽 RP-HPLC 纯化产物的最小抑菌浓度(MIC)测定结果

Table 3 MIC of RP-HPLC purified fraction from ion-exchangde productsof antimicrobial peptides $\mu\text{g/mL}$

波峰 Peak	鸡大肠杆菌 <i>E. coli</i> O78	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1056MRSA	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> ATCC10231	波峰 Peak	鸡大肠杆菌 <i>E. coli</i> O78	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1056MRSA	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> ATCC10231
峰 6 Peak 6	2.266	8.134	0.865	峰 12 Peak 12	1.880	0.031	—
峰 8 Peak 8	3.915	—	—	峰 13 Peak 13	0.627	—	—
峰 11 Peak 11	0.996	2.877	1.660	峰 15 Peak 15	—	0.001	0.035

注:“—”表示测定最小抑菌浓度(MIC)时数据不足。

Note:“—” denotes that the data are not sufficient.

由表 3 可知,6 个峰对 3 种细菌均表现较强的抑菌活性,在极低的质量浓度下就能起到抑菌作用;对鸡大肠杆菌 *E. coli* O78 活性最强的是峰 13,在质量浓度为 0.627 $\mu\text{g/mL}$ 时就能起到抑制作用;对金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 1056MRSA 和白色念珠菌 *C. albicans* ATCC10231 活性最强的是峰 15,分别在 0.001 和 0.035 $\mu\text{g/mL}$ 时就能起到抑菌作用。

3 讨 论

3.1 白细胞的获得

与从血液中分离得到白细胞相比,采用腹腔注射酪蛋白生理盐水^[5],刺激动物产生大量白细胞的方法更为可行,此法不仅能够得到大量的白细胞,而且省去了去除红细胞的繁琐步骤。但是,采用腹腔注射的方法,针头很容易刺伤内脏,造成动物急性死亡,在操作时应注意。

3.2 抗菌肽的提取

采用超声波反复破碎的方法使白细胞完全破碎,沉淀得到胞浆内颗粒组分。该法适用于处理较少的样品,且破碎效果较好。但是在采用该法的过

程中易产生大量的热量,需要在冰浴条件下操作。胞浆内颗粒组分采用乙酸浸提的方法,使抗菌肽尽可能多地释放出来,并且这样处理后,可以使遇酸变性的蛋白量大大降低。乙酸提取物中含有大量的乙酸,需要使用旋转蒸发仪在低压高温下除去乙酸,但温度不易过高,一般 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,约 30 min 即可除去乙酸。此时,得到的提取物浓度很低,且不易保存,采用低温冷冻干燥的方法,可以得到抗菌肽粗提物的冻干粉。

3.3 微量琼脂糖弥散法测定抗菌肽的抗菌活性

由于大多数抗菌肽在体内的含量少,难以得到大量的样品,因此建立微量而敏感的抑菌试验方法,在内源性抗菌分子的研究中显得尤为重要。微量琼脂糖弥散法在 1 mm 厚的底层凝胶上打直径为 3 mm 的圆孔,每孔加入 5 μL 待测样品,样品在底层凝胶中弥散,可最大限度地提高样品的有效抗菌浓度,此外,使用双层琼脂培养基技术,既能让抗菌物质充分发挥作用,又可有效支持细菌生长,从而使抗菌肽对代谢活跃的细菌发挥最有效的抗菌活性。该法可以大大提高抗菌试验的敏感性,具有灵敏度高、

样品用量少、操作简便、并可同时检测多个样品等优点^[10]。

3.4 阳离子交换层析

离子交换层析的目的是利用蛋白质表面的荷电基团与带相反电荷的不溶性基质结合^[11]。抗菌肽粗提物含有蛋白质、盐类和其他小分子物质,由于抗菌肽带正电荷,可作为其区别于其他物质的一个显著特性,因此采用 CM-Sepharose Fast Flow 弱酸性阳离子交换层析^[13-14],将粗提物中带正电荷的组分与其他物质分离开。但是在层析过程中,一定要注意加样时,不要让样品冲击凝胶面,注意保持凝胶面的平整,否则,会影响洗脱速度。在凝胶顶部放一层圆形滤纸,可以最大限度地保持凝胶表面的平整。大多数离子交换剂对蛋白质具有相当高的交换容量,此参数对于有效分离至关重要。因此,过柱时样品要有一定的浓度和体积,体积一般为柱体积的 1%~10%,浓度不易超过 1%~4%,浓度太高会影响洗脱速度,浓度也不宜太低,否则层析后难以检测到蛋白。为了得到理想的分辨率,样品体积应尽可能小,洗脱时要保持洗脱液流速均匀,压力一致。洗脱液的选择也十分重要,如果要分离的蛋白质需要很高的盐浓度才能从离子交换树脂洗脱下来,改变试验的 pH 会有所帮助。本研究选用的洗脱液为体积分数 10%乙酸、pH 值为 3.8,分离效果理想。

3.5 RP-HPLC 纯化

由于离子交换层析仅把带正电荷的组分与其他物质分离开,而动物白细胞抗菌肽种类复杂,且同种动物中抗菌肽的性质接近,RP-HPLC 分离的分辨率极高,因此使用 RP-HPLC 进行进一步的纯化,并采用分离能力强、洗脱强度好、紫外吸收本底低的乙腈-水-三氟乙酸洗脱系统进行梯度洗脱^[9,15]。

在本试验洗脱梯度的确定过程中,先用体积分数 95%乙腈在 0~100%梯度范围内进行洗脱,根据样品中活性物质出现的梯度范围,逐渐缩小洗脱的梯度范围,使分辨率逐渐提高,直到所需的各种物质能够明显分开为止。在此过程中,流速的调整也十分重要,根据柱长、填料和在相同梯度范围时的分离度,适当减小流速,可以增加分离度。另外,应在低波长(215 nm)下检测,此时肽键和所有共轭双键系统均有吸收,如果在 280 nm 下检测,只能检测出含色氨酸和酪氨酸的肽段,检不出其他的肽段。收集与检测器上出现吸收峰相对应的组分时,应计算和测量流动池与流出口之间的滞后时间,这样就不会失去该峰所含的组分,当组分不多时,最常用的可靠

方法是手工收集。

3.6 MIC 的测定

为了挑选出抑菌活性较强的抗菌肽组分,需要比较不同种类抗菌肽的抑菌强度,所以需要进行 MIC 的测定。本研究采用微量琼脂扩散法进行 MIC 的测定^[12],该法与微量肉汤稀释法相比不够灵敏,需要用肉眼观测试验结果,并且试验结果是根据不同稀释浓度抗菌肽的抑菌圈大小做标准曲线推测出的结果。但是,对于较少量的样品,特别是本试验,使用 RP-HPLC 分离后的微量样品,使用该法较为合适。

[参考文献]

- [1] Robert E W, Hancock. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. The Lancet Infectious Disease, 2001, 1: 156-164.
- [2] Hancock R E. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9(8): 1723-1729.
- [3] 安贤惠, 吕 毅, 李卫国, 等. 中国对虾 PC-III 系列抗菌肽的分离纯化及活性 [J]. 动物学研究, 2005, 26(4): 410-415.
An X H, Lu Y, Li W G, et al. Antimicrobial peptides purified from penus chinensis [J]. Zoological Research, 2005, 26(4): 410-415. (in Chinese)
- [4] 赵伟业, 董碧蓉, 周 焱. 兔防御素对耐药绿脓杆菌的抗菌活性及机制研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(1): 83-85.
Zhao W Y, Dong B R, Zhou Y. *In vitro* antimicrobial activity of defensins from rabbit neutrophils against pseudomonas aeruginosa and its multiple-drug-resistance strains [J]. Journal of Sichuan University: Medical Science Edition, 2005, 36(1): 83-85. (in Chinese)
- [5] 崔东波, 郑彦杰, 王运吉, 等. 蚯蚓抗菌肽的分离 [J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(4): 265-268.
Cui D P, Zheng Y J, Wang Y J, et al. Purification of antibacterial peptides from earthworm [J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2004, 23(4): 265-268. (in Chinese)
- [6] 王莉莉, 潘小玲, 黄 宁, 等. 人子宫内膜粘液抗菌多肽的分离纯化 [J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26(1): 5-6.
Wang L L, Pan X L, Hang N, et al. Isolation and characterization of antibacterial polypeptide from human uterus mucus [J]. Sichuan Journal of Physiological Science, 2004, 26(1): 5-6. (in Chinese)
- [7] 王永杰, 齐 名. 连续酸-尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳制备人和兔中性粒细胞防御素各组分 [J]. 医学研究生学报, 2001, 14(2): 106-109.
Wang Y J, Qi M. Preparation of components of defensins from human and rabbit neutrophils by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis (CAU-PAGE) [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2001, 14(2): 106-109. (in Chinese)

(下转第 39 页)