

牛红细胞源抗菌肽的分离纯化与活性鉴定

胡建和, 杭柏林, 王 青, 董永军, 王三虎, 刘兴友

(河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

【摘 要】 **【目的】**分离纯化牛红细胞中的抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs), 并对其体外抗菌活性进行初步检测。**【方法】**以中国荷斯坦奶牛血液为材料, 通过离子交换层析法和反相高效液相色谱法(RP-HPLC)纯化抗菌肽, 用琼脂糖平板扩散法测定其抗菌活性, 并用质谱法测定其分子质量。**【结果】**牛血液红细胞粗提物经离子交换层析获得的阳离子峰有抗菌活性; 阳离子峰经 RP-HPLC 纯化后, 共得到 4 个峰(F1、F2、F3 和 F4), 其对大肠杆菌均具有抗菌活性, F1 峰和 F3 峰对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性, 仅 F1 峰对白色念珠菌具有抗菌活性; 经质谱分析, F1 峰纯化肽的分子质量为 2 562.40 u。**【结论】**成功地从牛红细胞中分离纯化到了 AMPs; F1 峰中 AMPs 的抗菌谱较广, 抗菌活性较强。

【关键词】 抗菌肽; 牛红细胞; 抗菌活性

【中图分类号】 S859.79⁺7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)02-0036-05

Isolation, purification and activity identification of antimicrobial peptides from bovine red blood cells

HU Jian-he, HANG Bo-lin, WANG Qing, DONG Yong-jun,

WANG San-hu, LIU Xing-you

(School of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: **【Objective】**Antimicrobial peptides were isolated and purified from bovine red blood cell, and their antimicrobial activities *in vitro* were analyzed. **【Method】**Antimicrobial peptides from bovine red blood cells were isolated by ion exchange chromatography and purified by RP-HPLC. Antimicrobial activity of purified peptide was tested by agrose radial diffusion assay. Molecular mass of purified peptide which had good antimicrobial activity was determined by mass spectrography. **【Result】**The cation peak acquired by ion exchange chromatography had antimicrobial activity. Four peaks acquired by RP-HPLC had the activity against *E. coli*, peak F1 and peak F3 had the activity against *Staphylococcus aureus*, only peak F1 had the activity against *Candida albicans*. Molecular mass of purified peptide of peak F1 was 2 562.40 u. **【Conclusion】**Antimicrobial peptides were isolated and purified successfully from bovine red blood cells. Antimicrobial peptide of peak F1 had broad antibacterial spectrum and good antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial peptide; bovine red blood cell; antimicrobial activity

随着耐药性病原细菌的不断出现, 寻找和开发新的安全高效抗菌药物代替传统的抗生素变得越来越重要。目前, 最有希望成为抗生素替代品的当属

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)^[1]。AMPs 是生物机体抵抗自然界微生物侵袭的一类基本防御物质^[2]。20 世纪 70 年代, 在两栖类动物、昆虫及植

* [收稿日期] 2009-08-15

[作者简介] 胡建和(1968—), 男, 河南辉县人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物微生物学、免疫学与分子病毒学研究。
E-mail: hujianhe@hist. edu. cn

[通信作者] 刘兴友(1963—), 男, 重庆市人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物传染病学与分子病原学研究。
E-mail: lxy63@hist. edu. cn

物中发现了有抗微生物活性的肽,从而引起人们分离其他物种 AMPs 的极大兴趣,许多来自不同物种的 AMPs 相继被发现^[3],如来源于牛^[4]、猪^[1,5]、蚯蚓^[6]和人^[7]等的 AMPs 已被分离和鉴定。

近年来,首次报道于 1999 年的血红蛋白源 AMPs^[8],引起了研究人员的广泛关注。有文献报道,人月经血^[9]和牛血红蛋白^[4]有抗微生物活性。Liepke 等^[7]研究表明,人工合成的血红蛋白片段具有抗菌活性。不同动物血红蛋白存在多种 AMPs。由此看来,血红蛋白除了运输氧的功能外,还具有提供机体天然防御 AMPs 的功能。因此,有研究者提出,血红蛋白多肽片段是天然免疫系统中 AMPs 家族的成员之一,不易产生耐药性,可能是新型抗菌药物的重要来源^[10]。

目前,国内尚未见从牛红细胞中分离 AMPs 的报道。为此,本试验主要从牛血液红细胞中分离纯化 AMPs,并对其抗微生物活性进行了初步鉴定,以期为新兽药的研究与开发拓展新途径,为 AMPs 的进一步开发和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

肝素为河南科技学院动物科学学院生理教研室惠赠,胰蛋白酶解酪蛋白大豆肉汤为 Cole-Parmer 公司产品,超纯琼脂糖、多粘霉素 B、制霉素均为 Sigma 公司产品,尼生素(乳酸链球菌肽)为兰州伟日公司产品。乙腈为天津四友公司产品,一级色谱纯;三氟乙酸为科密欧公司产品,一级色谱纯。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌均为河南科技学院动物科学学院预防兽医学实验室保存。

冷冻干燥机为德国 CHRIST 公司产品,型号为 Alpha 1-4LSC;高速冷冻离心机为美国 BECKMAN 公司产品,型号为 Avanti J-25;离子色谱仪为美国 Dionex 产品,型号为 ICS2000;离子交换柱为美国 BioRad 产品,型号为 Macro-Prep CM;紫外分光光度检测器为美国 PerkinElmer 公司产品,型号为 Lambda35;高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品,型号为 2695;色谱柱为美国 Phenomenex 公司产品,型号为 Jupiter 4u Proteo 90A;全自动高压灭菌器为日本 Hirayama 公司产品,型号为 HV85。

1.2 血液的采集与处理

在屠宰场,于健康中国荷斯坦奶牛刺杀放血时,将其血液收集于含肝素的试管中,于 4℃、700×g 离心 15 min,弃去上层液体,用灭菌生理盐水洗涤红细

胞,重复 3 次,再用 8.3 g/L 氯化铵溶液溶解红细胞(V(氯化铵溶液):V(红细胞)=3:1),然后于 4℃、700×g 离心 15 min 去除白细胞,将含血红蛋白片段的溶液冻干后,用体积分数 0.01%乙酸溶解。

1.3 AMPs 的纯化

采用阳离子交换层析法,对粗提的血红蛋白溶液进行初步分离,样品以 20 mL/h 的速率通过离子交换柱,用紫外分光光度检测器检测 230 nm 波长吸光值,收集洗脱峰(5 mL/峰)。样品通过阳离子交换柱时,阳离子复合物结合在阴离子树脂上,用 25 mmol/L 乙酸铵洗去非阳离子成分,再用体积分数 10%乙酸洗脱阳离子成分,收集洗脱液。将收集的洗脱液冻干后用体积分数 0.01%乙酸重悬,用琼脂糖平板扩散法^[11]检测其抗菌活性。

用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)进一步分离离子交换层析所获得的有活性峰液中含有的肽。试验所用不同梯度的 A-B 流动相体积分数及梯度范围为:缓冲液 A:5%乙腈,0.1%三氟乙酸;缓冲液 B:95%乙腈,0.1%三氟乙酸;梯度为 30%~40% B,梯度运行时间为 40 min;检测波长为 215 nm。手工按峰收集各个组分,冻干后,用体积分数 0.01%乙酸溶解。

1.4 AMPs 抗菌活性的检测

用琼脂糖平板扩散法^[11]测定离子交换法和反相高效液相色谱法分离的 AMPs 的抗微生物活性。将供试微生物分别涂布于已消毒的含营养物质的下层培养基(10 mL 胰蛋白酶解酪蛋白大豆肉汤,10 g 超纯琼脂糖,1 L 蒸馏水,pH 7.4)上,用打孔器打孔,孔径约 2 mm,酒精灯稍加热进行封底。向每孔中加入 5 μL 测试样品,每个平板均设阳性对照和阴性对照,阳性对照孔加常用的抗生素:多粘霉素 B(针对革兰氏阴性菌),尼生素(针对革兰氏阳性菌),制霉素(针对白色念珠菌);阴性对照孔加体积分数 0.01%乙酸 5 μL。将平板 37℃倒置 1 h,以使测试液扩散入琼脂糖中。再添加 10 mL 上层培养基(50℃左右,营养成分同下层培养基)。平板在 37℃条件下,倒置培养过夜,用游标卡尺测定抑菌圈直径。

1.5 AMPs 的质谱分析

将抗菌活性较好的纯化肽送交北京蛋白质组研究中心生物质谱实验室进行质谱分析。

2 结果与分析

2.1 AMPs 的纯化

从图 1 可以看出,试验共得到 2 个峰,其中峰 A

为非阳离子峰,峰 B 为阳离子峰。抗菌活性检测结果表明,峰 A 对供试微生物没有抗菌活性,而峰 B 具有抗菌活性。峰 B 经反相高效液相色谱(RP-HPLC)进一步分离后,共得到 F1、F2、F3 和 F4 4 个主要峰(图 2),按峰收集,冻干,以供抗菌活性测定和质谱分析用。

2.2 AMPs 的抗菌活性

由图 3 可知,4 个峰成分对大肠杆菌均具有抗菌活性,F1 峰和 F3 峰对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性,而仅 F1 峰对白色念珠菌具有抗菌活性。结果表明,F1 峰中相应的 AMPs 抗菌谱较广,抗菌活性较好。

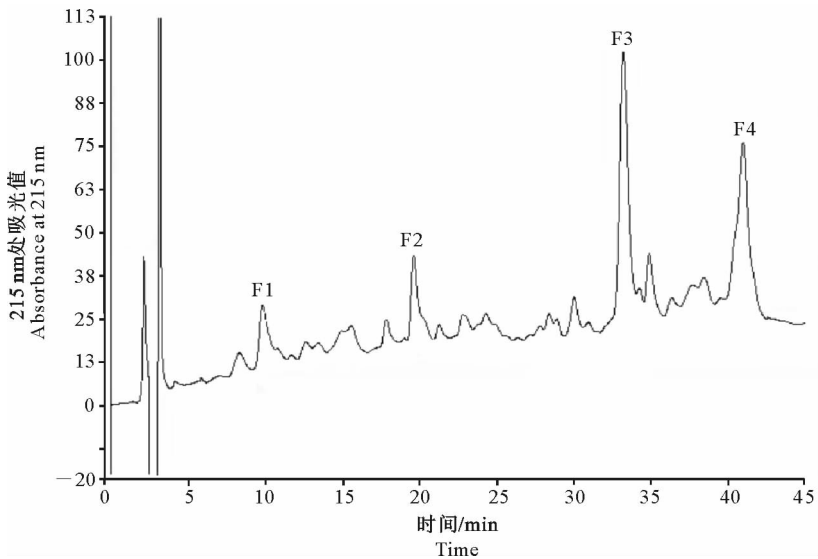


图 2 牛血液红细胞提取物阳离子峰 B 的 RP-HPLC 分离结果
F1—F4. 分别为所收集的 4 个 RP-HPLC 峰

Fig. 2 RP-HPLC chromatograph of the cation peak B of extract of bovine red blood cells
F1—F4. Represent 4 collected peaks from RP-HPLC respectively

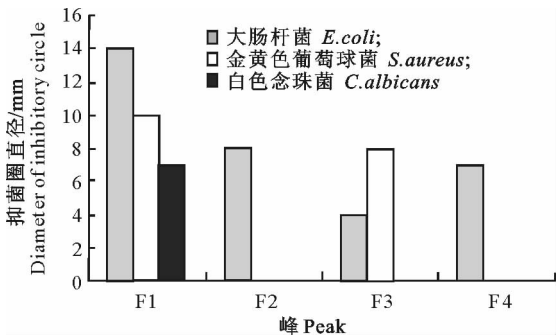


图 3 牛血液红细胞提取物 RP-HPLC 分离各峰的抑菌效果
Fig. 3 Antimicrobial activity of RP-HPLC purified fractions from extract of bovine red blood cells

2.3 AMPs 的质谱分析

对经过平板扩散试验检测的、抗菌活性较好的、

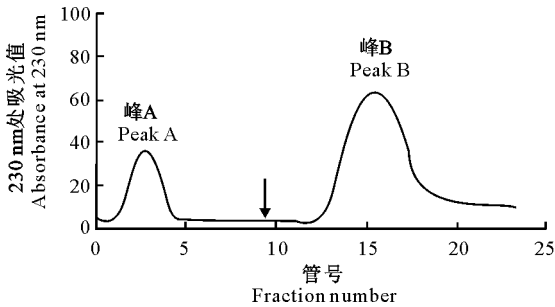


图 1 牛血液红细胞粗提物的离子交换层析结果
箭头处表示洗脱液从 25 mmol/L 乙酸铵变为体积分数 10% 乙酸

Fig. 1 Ion exchange chromatography of the crude extract of bovine red blood cells
The arrow shows where the runningbuffer was changed from 25 mmol/L ammonium chloride to 10% acetic acid

F1 峰中的纯化肽进行质谱分析,结果(图 4)表明,其分子质量为 2 562.40 u。

3 讨论

3.1 AMPs 的提取

提取物质采取何种分离纯化方法由所提取的组织材料、被提取物质的性质决定。对多肽进行分离常用的方法有:盐析法、超滤法、凝胶过滤法、等电点沉淀法、离子交换层析、亲和层析、吸附层析、逆流分溶、酶解法等,这些方法常常组合在一起,用于特定物质的分离纯化。AMPs 作为一种多肽类物质,其提取方法也经历了一个由复杂到简单,由低产率到高产率的过程。从动物体内粗提 AMPs,大都使用

化学试剂提取法^[12-13]。本试验先采用氯化铵破碎红细胞获得抗菌肽粗提物,然后再采用离子交换法和反相高效液相色谱进一步纯化。在经过离子交换

后,获得了阳离子峰和非阳离子峰,对其进行抗菌活性测定,然后将有抗菌活性的部分用反相高效液相色谱进行纯化,而没有抗菌活性的部分则予以淘汰。

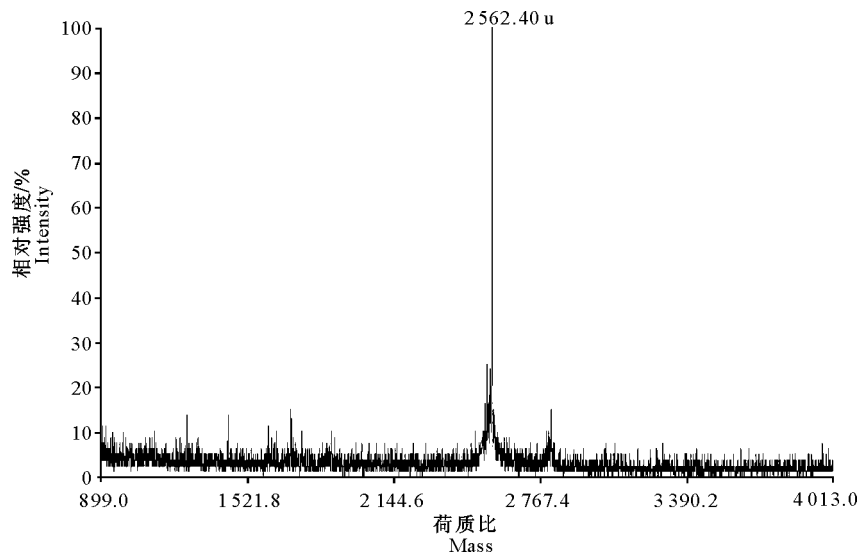


图 4 牛血液红细胞提取物 RP-HPLC 分离峰 F1 的质谱分析

Fig. 4 Mass spectrography of the peak F1 of RP-HPLC from extract of bovine red blood cells

3.2 AMPs 抗菌活性的检测

大多数抗菌肽在生物机体内的含量很少,很难得到大量样品,必须通过微量敏感的方法来检测其抗菌活性。而具有高灵敏度、样品用量少、操作简单并可同时检测多个样品等特点的微量琼脂糖平板扩散法可满足这一要求,因此本试验采用了这一方法。

在测定所分离的 AMPs 的抗微生物活性时,一般的做法是选择不同类型微生物的典型代表进行测试。本研究选取了金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌分别作为革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及病原真菌的代表,其缺点是不能完全代表各类型的微生物。在今后的研究中,本研究小组将进一步扩大受试菌株的范围,特别是针对临床中对动物养殖危害较大的细菌,并将逐步扩大到致病性病毒及寄生虫等。

3.3 血红蛋白的抗菌活性

血红蛋白除了携氧的主要功能外,也是一种内源性生物活性蛋白多肽^[9]。有研究表明,血红蛋白在红细胞内可自然生成一些较大的片段,然后分泌到红细胞外,在细胞外进一步酶解为较小的血红蛋白片段,形成所谓的“血红蛋白肽库”,发挥其生物学效应^[14]。早期研究认为,血红蛋白及其片段具有促进细菌生长的作用^[15]。而近年来,许多学者在鉴定活体动物(包括人)的抗菌肽分子时发现,所分离的抗菌分子是血红蛋白片段。Parish 等^[16]研究证实,

完整的人的 α -血红蛋白(hHEM- α)和 β -血红蛋白(hHEM- β)均具有抗菌活性。Liepke 等^[7]发现,人红细胞的血红蛋白降解成小片段分子后,能有效地抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及酵母菌等的生长。Fogaca 等^[8]从寄生于牛体的蜱肠内容物里分离提纯出具有抗菌活性的牛血红蛋白片段,认为这是蜱利用宿主血红蛋白片段的抗菌活性来防御病原微生物的侵害。本试验从牛血红细胞中分离纯化到的一种 AMPs,此种 AMPs 对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌大肠杆菌和病原真菌白色念珠菌具有明显的杀灭或抑制作用,其在动物细菌性疾病治疗或预防、牛奶保鲜及饲料防霉等领域,具有潜在的应用价值。

[参考文献]

[1] 张艳梅,余锐萍,刘天龙,等.猪血中抗菌肽类物质的分离纯化和抗菌活性研究[J].科技导报,2008,26(2):33-37.
Zhang Y M, She R P, Liu T L, et al. Studies on isolation, purification and antibacterial activities of antibacterial peptides in swine blood [J]. Science & Technology Review, 2008, 26(2): 33-37. (in Chinese)

[2] Ganz T. Defensin: antimicrobial peptides of innate immunity [J]. Nature Reviews Immunol, 2003, 3: 710-720.

[3] Naima N A, Veronique D D, Estelle Y A, et al. Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides [J]. Peptides, 2008, 29(6): 969-977.

[4] Rachid D, Veronique D, Loredana B D, et al. New antibacterial

- peptide derived from bovine hemoglobin [J]. *Peptides*, 2005, 26(5): 713-719.
- [5] 马卫明, 余锐萍, 靳红, 等. 猪小肠抗菌肽的抗菌作用研究 [J]. *中国兽医杂志*, 2005, 41(1): 3-7.
- Ma W M, She R P, Jin H, et al. Activity of antibacterial peptides extracted from pig small intestine against 11 strains of bacteria [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(1): 3-7. (in Chinese)
- [6] 张希春, 孙振钧, 高锦, 等. 蚯蚓抗菌肽 EABP-1 的分离纯化及部分性质 [J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(1): 36-38.
- Zhang X C, Sun Z J, Gao J, et al. Purification and characterization of antibacterial peptide EABP-1 from annelid *elsenia fetida* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2003, 9(1): 36-38. (in Chinese)
- [7] Liepke C, Baxmann S, Heine C, et al. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides [J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 791(1/2): 345-356.
- [8] Fogaca A C, Silva P I, Miranda M T, et al. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *boophilus microplus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(36): 25330-25334.
- [9] 王莉莉, 潘小玲, 马懿, 等. 子宫内膜黏液抗菌肽的分离纯化及鉴定 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(29): 2044-2048.
- Wang L L, Pan X L, Ma Y, et al. Antiraicrobial pepfide may originate from hemoglobin and play a role in the antibacterial mechanisms of endometrium [J]. *National Medical Journal of China*, 2006, 86(29): 2044-2048. (in Chinese)
- [10] 周新娥, 欧阳运薇, 潘小玲, 等. 人血红蛋白及其片段体外抗菌活性研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2008, 39(3): 355-359.
- Zhou X E, Ouyang Y W, Pan X L, et al. Study on antimicrobial activity of human hemoglobin and its fragments both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Journal of Sichuan University: Medical Science Edition*, 2008, 39(3): 355-359. (in Chinese)
- [11] Lehrer R I, Rosenman M, Harwig S S, et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides [J]. *J Immunol Methods*, 1991, 137(2): 167-173.
- [12] 杨玉荣, 余锐萍, 彭开松. 鸡肠道抗菌肽 Gal-13 的乙酸提取及其工艺优化 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2008, 36(9): 22-26.
- Yang Y R, She R P, Peng K S. Isolation of antimicrobial peptide Gal-13 from chicken intestine and optimization of extracting technology [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2008, 36(9): 22-26. (in Chinese)
- [13] 王可洲, 余锐萍. 兔圆小囊组织中抗菌肽类物质的分离纯化及抗菌活性研究 [J]. *科学技术与工程*, 2003, 3(2): 151-155.
- Wang K Z, She R P. Isolation and purification of antibacterial peptide from rabbit sacculus rotundus and its antibacterial activity study [J]. *Science Technology and Engineering*, 2003, 3(2): 151-155. (in Chinese)
- [14] Ivanov T, Karelin A A, Philppovam M. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool [J]. *Biopolymers*, 1997, 43(2): 171-188.
- [15] Zhao Q Y, Plot J M, Gautier V, et al. Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptide bovine hemoglobin hydrolysate [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45(6): 778-784.
- [16] Parish C A, Jiang H, Tokiwa Y, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2001, 9(2): 377-382.