

毛蚶血浆中抗菌蛋白的纯化及抗菌活性研究

郭道森¹, 魏玉西¹, 李 丽¹, 陈皓文²

(1. 青岛大学 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 采用硫酸铵分级盐析、Sephadex G-25 柱脱盐和 Bio-gel P-10 柱层析等方法, 从毛蚶 (*Scapharca subcrenata*) 血浆中分离纯化出了抗菌作用较强的蛋白组分。结果表明, 该抗菌蛋白组分对供试革兰氏阳性细菌即金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*) 具有较强的抑菌活性, 而对供试革兰氏阴性细菌即大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 无抑菌活性; 对供试真菌尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、细链格孢 (*Alternaria tenuis*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的菌丝生长有一定的抑制作用, 对柑桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 和松球壳孢菌 (*Sphaeropsis sapinea*) 无抑菌作用。性质试验表明, 该抗菌蛋白组分具有很好的热稳定性, 120℃ 处理 30 min 其抑菌活性仍保持 85% 以上, 对胰蛋白酶和蛋白酶 K 不敏感。

关键词: 毛蚶 (*Scapharca subcrenata*); 抗菌蛋白; 纯化; 抗菌活性

中图分类号: Q178.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)03-0025-05

毛蚶 (*Scapharca subcrenata*) 隶属瓣鳃纲软体动物, 其肉质鲜嫩、营养丰富, 被人们广泛食用, 是我国一种常见的海水养殖双壳贝类。它大量栖息于有一定淡水影响的内湾或较平静的浅海软泥或含沙泥质海底。在自然条件下, 其生活环境存在大量的不同种类的病原菌, 但一般条件下, 并不是所有的这些病原菌都能对其感染并造成危害, 主要是因为它具有一套完善的防御体系, 能够抵御外来病原生物的侵扰。在其防御反应过程中, 除了血细胞本身的作用外, 其血淋巴中含有的多种具生物活性物质如溶菌酶、凝集素、溶血素和防卫素等^[1,2] 也起到了十分重要的作用。有关双壳贝类血淋巴抗菌物质方面的研究, 国内研究报道较少^[3~5], 国外已对贻贝、扇贝等双壳贝类体中抗菌蛋白特别是防卫素等抗菌物质开展了大量研究, 并取得了一些进展^[1,2,6~8]。但有关毛蚶血浆中抗菌蛋白方面的研究尚未见报道。作者以毛蚶为试验材料, 以金黄色葡萄球菌等为指示菌, 对其血浆中的抗菌蛋白进行了初步纯化, 并对获得的抗菌蛋白组分的抑菌活性和部分性质进行了研究, 以期为进一步纯化抗菌蛋白奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试毛蚶及其血浆的制备

供试毛蚶为青岛近海产。挑选鲜活、大小一致的成体毛蚶, 先经无菌生理盐水反复漂洗后, 剖开外壳, 用一次性注射器采集其红色血淋巴, 加海洋抗凝剂及蛋白酶抑制剂^[9], 9600 r/min, 5℃ 离心 30 min, 收集上清液(即血浆)备用。

1.2 抗菌蛋白的纯化

1.2.1 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析

取一定体积的毛蚶血浆, 在搅拌下缓慢加入固体 (NH₄)₂SO₄, 使其饱和度达到 25%, 9600 r/min, 5℃ 离心 30 min 收集上清液。重复上述的操作使 (NH₄)₂SO₄ 饱和度分别达到 45%、65% 和 80%, 分

收稿日期: 2003-11-21; 修回日期: 2004-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40086001)

作者简介: 郭道森 (1957-), 男, 山东省齐河县人, 博士, 副教授, 从事天然抗菌活性物质的研究, E-mail: guodaosen@sohu.com; 魏玉西, 通讯联系人, E-mail: weiyuxi@sohu.com

别收集各饱和度上清液和沉淀, 沉淀溶于少量磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH6.5), 稀释至一定蛋白浓度, 再经细菌滤膜过滤后, 检测对金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 以同种缓冲液和不同饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液作空白对照, 根据抑菌圈大小, 确定最佳分级盐析的两个饱和度。

1.2.2 柱层析脱盐和进一步纯化

将盐析后得到的抗菌蛋白粗提液加到预先用上述磷酸盐缓冲液平衡过的 Sephadex G-25 柱上, 用同一种缓冲液洗脱, 在 A_{280} 处检测吸收峰, 收集蛋白峰洗脱液, 浓缩。将脱盐后浓缩的蛋白液上 Bio-gel P-10 柱, 并用同一种磷酸盐缓冲液洗脱, 流速为 10 mL/h, 在 A_{280} 处检测吸收峰, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 收集活性峰, 测定蛋白质浓度后即作为本试验的抗菌蛋白液样品。

1.2.3 蛋白质浓度的测定

采用 Folin-酚试剂法^[10], 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3 抗菌蛋白的部分性质测定

1.3.1 抑菌活性的测定

在抗菌蛋白提取过程中, 抗菌活性的追踪是以金黄色葡萄菌为指示菌, 采用平板生长抑制法 (Plate Growth Inhibition Assay)^[11]。取斜面上活化好的菌苔, 用无菌生理盐水制成 $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL 的菌悬液。取菌悬液 0.2 mL, 加至无菌平皿中, 立即倒入融化后冷却至 45℃ 左右的培养基 15 mL, 随即快速地晃动平皿, 使菌液与培养基充分混匀后平置, 待凝, 备用。在制好的含菌平板上打直径 2.5 mm 的孔穴, 每一孔穴滴加待测样品 8 μ L, 置 37℃ 培养 24 h, 测量抑菌圈直径。

1.3.2 热稳定性实验

取适量抗菌蛋白液样品装入 Eppendorf 管内, 分别置于 40、60、80、100、120℃ 下恒温 30 min, 检测对金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 方法同 1.3.1。以未经热处理的样品 (室温 20℃) 作对照, 其抑菌活性定为 100%, 按各处理的抑菌圈大小, 换算成活性百分比。

1.3.3 对蛋白酶的敏感性

在抗菌蛋白液样品中分别加入胰蛋白酶 (10 mg/L) 和蛋白酶 K (10 mg/L), 在最适酶促条件下, 37℃ 处理 2 h, 分别测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 以不加酶液处理的样品、胰蛋白酶、蛋白酶 K 作对照。

1.4 抑菌谱的测定

1.4.1 供试菌株

革兰氏阳性细菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*); 革兰氏阴性细菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)。供试菌株均由中国海洋大学食品工程实验室提供。

除副溶血弧菌的培养用 ZoBell 2216E 琼脂培养基^[12]外, 其余菌株的培养采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[13]。

1.4.2 供试真菌

松球壳孢菌 (*Sphaeropsis sapinea*); 尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*); 灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*); 细链格孢 (*Alternaria tenuis*); 柑桔青霉 (*Penicillium citrinum*); 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。各供试菌株均由本实验室贮藏。

1.4.3 测定方法

抗细菌谱测定同 1.3.1。抗真菌谱测定是将供试真菌菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 平板 (直径 9 cm) 上, 28℃ 培养至菌落直径为 4 cm 左右, 在菌落 (边缘处) 前方 0.5 cm 处打直径为 5 mm 的孔穴, 滴加待测样品 20 μ L, 以滴加相同体积的磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L pH6.5) 作空白对照, 继续置 28℃ 培养 48 h, 观察所形成的抑菌圈, 测量抑菌圈直径。每一菌株重复 3 次。

2 结果

2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度的确定

以金黄色葡萄球菌为指示菌, 对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀血浆后收集到的上清液和沉淀分别进行了抑菌活性测定, 结果见表 1。

由表 1 可知, 以 25% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析所得沉淀抑菌活性较低, 而上清液抑菌活性较强; 在 25%~65% 饱和度之间, 随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度的逐渐提高, 蛋白质沉淀物抑菌活性逐渐增强, 但在 65% 以上饱和度条件下, 上清液几乎无抑菌活性, 沉淀抑菌活性也较弱, 说明 65% 饱和度时抗菌活性物质已基本上沉淀完全。由此, 从有利于进一步分离纯化抗菌蛋白角度来考虑, 确定分级盐析的两个饱和度为 25% 及 65%。实际操作时先在毛蚶血浆中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 25% 饱和度, 4℃ 过夜离心去沉淀, 上清液补加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 65% 饱和度, 收集

沉淀用于柱层析脱盐和初步纯化。

表1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析对提取抗菌蛋白的影响

Tab.1 Effect of ammonium sulfate saturation on antimicrobial protein activity

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析 饱和度 (%)	血浆样品	抑菌圈直径(mm)
25	上清液	8.3
	沉淀	2.5
25~45	上清液	7.6
	沉淀	8.7
45~65	上清液	2.6
	沉淀	10.2
65~80	上清液	0
	沉淀	3.0

注：分别以磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH6.5) 和 80% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液作为空白对照，结果显示对照组对指示菌均无抑菌活性。

2.2 柱层析脱盐、纯化

将经 Sephadex G-25 柱脱盐后浓缩的蛋白液样品上样于 Bio-gel P-10 凝胶柱，分部收集，得到的洗脱曲线如图 1。从图 1 可以看出，在紫外光 280 nm 处获得 3 个蛋白峰。用金黄色葡萄球菌作为指示菌，对这 3 个峰分别进行抑菌活性检测时，发现第 I 和第 II 峰皆无抑菌活性，而蛋白峰 III 显示出很强的抑菌活性。合并峰 3 的洗脱液，经测定蛋白质含量为 22.44 mg/L。

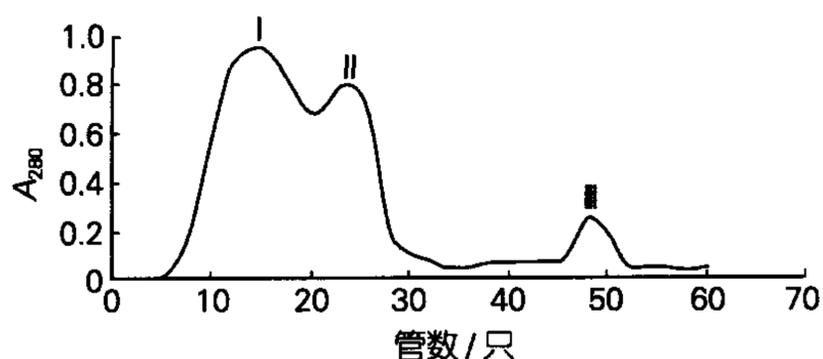


图 1 抗菌活性物质 Bio-gel P-10 柱层析

Fig.1 Elution profile of antimicrobial substance by Bio-gel P-10 chromatography

2.3 抗菌蛋白对热的稳定性

抗菌蛋白的热稳定性试验结果见图 2。由图 2 可看出，抗菌蛋白在 40~80℃ 范围内，可保持 100%

抑菌活性，在 100℃ 处理 30 min，活性保持原有活性的 93.5%，在 120℃ 下处理 30 min，活性仍能保持原有活性的 84.5%。这一结果表明获得的毛蚶抗菌蛋白具有很强的热稳定性。

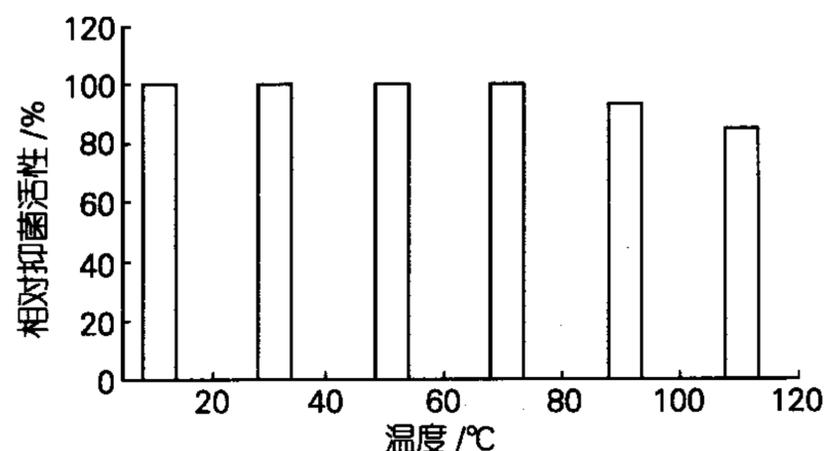


图 2 温度对粗蛋白抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on the inhibitory activity of the antimicrobial protein

2.4 对蛋白酶的敏感性

经活性测定，抗菌蛋白对胰蛋白酶和蛋白酶 K 均不敏感，仍能保持原有的活性大小，而胰蛋白酶和蛋白酶 K 对照未表现出抑菌活性。

2.5 抗菌蛋白的抑菌谱

选择 6 种细菌和 6 种真菌为指示菌，检测抗菌蛋白的抑菌谱，结果见表 2 和表 3。

由表 2 可看出，抗菌蛋白对供试的 3 种革兰氏阳性细菌具有抑菌活性，其中对金黄色葡萄球菌抑菌作用最强，抑菌圈直径达到 13.5 mm，对枯草杆菌作用次之，对四联球菌作用较弱，而对大肠杆菌、变形杆菌和副溶血弧菌 3 种革兰氏阳性细菌无抑菌活性，说明该抗菌蛋白仅对革兰氏阳性细菌有抑菌活性。

表 2 毛蚶血浆抗菌蛋白对细菌的抑菌活性

Tab.2 The antibacterial spectrum of antimicrobial protein from *Scapharca subcrenata*

菌株	抑菌圈直径(mm)
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	13.5
枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	11.0
四联微球菌(<i>Micrococcus tetragenus</i>)	7.2
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0
普通变形菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	0
副溶血弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	0

表3 毛蚶血浆抗菌蛋白对真菌的抑菌活性

Tab.3 The antifungal spectrum of antimicrobial protein from *Scapharca subcrenata*

菌株	抑菌圈直径(mm)
松球壳孢菌(<i>Sphaeropsis sapinea</i>)	0
尖镰孢(<i>Fusarium oxysporum</i>)	10.2
灰葡萄孢(<i>Botrytis cinerea</i>)	6.3
细链格孢(<i>Alternaria tenuis</i>)	8.0
柑桔青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)	0
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	6.5

表3表明, 抗菌蛋白对检测的6种真菌表现出不同程度的抑菌活性, 其中对尖镰孢的生长抑制较强, 抑菌圈直径为10.2 mm, 对细链格孢次之, 对黑曲霉和灰葡萄孢抑制活性较弱, 而对柑桔青霉和松球壳孢菌无抑菌活性。

3 讨论

在国外, 双壳贝类的抗菌物质尤其防卫素是近年来研究的一个热点。Charlet等^[6]从贻贝(*Mytilus edulis*)血淋巴中提取到一种具有广谱抑制细菌活性的防卫素 Mytilin B; Hubert等^[7]从紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)血浆中分离到一种对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌都有活性的防卫素 MGD-1; 随后Mitta等^[1,2]又从紫贻贝的血细胞和血浆中分离到有抗菌活性的防卫素 Myticin A、Myticin B、Mytilin C、Mytilin D和Mytilin G1。Nilsen等^[8]从扇贝(*Chlamys islandica*)内脏液中纯化出一种对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌都有活性的称为扇贝素(chlamysin)的抗菌蛋白。国内有关双壳贝类抗菌物质的研究尚处于起步阶段, 陈皓文^[3]研究了毛蚶(*Scapharca subcrenata*)体液凝集素对不同细菌的凝集作用; 魏玉西等^[4,5]对贻贝(*Mytilus edulis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinesis*)等4种双壳贝类血淋巴的抗细菌活性进行了测定, 并从菲律宾蛤仔血浆中分离纯化出一种新的防卫素—PD-1。但上述研究均未涉及毛蚶血浆中抗菌蛋白的提取及其抑菌活性测定方面。研究双壳贝类血淋巴中抗菌物质不仅有利于了解该类动物在自然状况下的

防御机制, 而且对开发新型抗生素等方面的研究也具有重要的意义。

实验结果表明, 经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-25柱脱盐和Bio-gel P-10柱纯化而获得的抗菌蛋白组分, 对供试的革兰氏阳性细菌具有较强的抑菌活性, 对部分供试真菌也有一定的抑制作用, 但对供试的革兰氏阴性细菌无抑菌活性, 说明此抗菌蛋白组分对不同细菌和真菌具有选择性抑菌活性。另外, 此抗菌蛋白组分于120℃处理30 min后抑菌活性仍保持85%以上, 对胰蛋白酶和蛋白酶K不敏感, 说明此抗菌蛋白相当稳定, 具有特殊的性质。

参考文献:

- [1] Mitta G, Hubert F, Noel T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 265:71-78.
- [2] Mitta G, Vandebulcke F, Hubert F, et al. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17):12 954-12 956.
- [3] 陈皓文, 孙丕喜. 毛蚶体液来克丁的凝集作用[J]. *黄渤海海洋*, 1999, 17(4):60-65.
- [4] 魏玉西, 郭道森, 李丽, 等. 几种海产双壳贝类血淋巴中抗菌物质的诱导及其活性测定[J]. *海洋科学*, 2002, 26(8):5-8.
- [5] 魏玉西, 郭道森, 李荣贵, 等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinesis*)血浆中防卫素的纯化及其抑菌功能[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(12):1 145-1 148.
- [6] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood and a mollusc, *Mytilus edulis*[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(16):21 808-21 813.
- [7] Hubert F, Noel T, Roch P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 240:302-306.
- [8] Nilsen I W, Overbo K, Sandsdalen E, et al. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity[J]. *FEBS Letters*, 1999, 464(3):153-158.
- [9] Schnapp D, Kemp G D, Smith V J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 240:532-539.
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 137-138.
- [11] Bulet P, Cociancich S, Dimarcq J, et al. Insect immunity.

Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family[J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(36):24 520-24 525.

[12] 张士瑾, 范晓, 马军英主编. 海洋生物技术原理和应用[M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 10-11.

[13] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 214.

Purification of antimicrobial protein from plasma of the mussel *Scapharca subcrenata* and its antimicrobial activity

GUO Dao-sen¹ WEI Yu-xi¹ LI Li¹ CHEN Hao-wen²

(1. Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Received: Nov., 21, 2003

Key words: *Scapharca subcrenata*; antimicrobial protein; purification; antimicrobial activity

Abstract: The antimicrobial protein from plasma of the mussel *Scapharca subcrenata* was purified by ammonium sulphate precipitation and column chromatography on Sephadex G-25 and Bio-gel P-10. The inhibitory spectrum showed that the protein had a strong inhibiting activity against the Gram-positive bacteria of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus tetragenus*, but it had no inhibiting activity to the Gram-negative bacteria of *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio parahaemolyticus*. The protein also had some inhibitory effects on the hyphal growth of fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*. It was found that the protein was thermostable and insensitive to proteinase K and trypsin.

(本文编辑: 张培新)