

草鱼肠道抗菌肽对细菌形态结构的影响及理化性质研究

黄平^{1a}, 陈韬^{1b,2}, 彭宽^{1b}, 黄小西^{1b}, 章怀云^{1b*}, 张东裔^{1b,3*}

(1.中南林业科技大学 a.生命科学与技术学院; b.生物技术开放性中心实验室, 湖南 长沙 410004; 2.湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 3.长沙学院 生物技术研究, 湖南 长沙 410003)

摘要: 通过扫描电子显微镜观察草鱼肠道抗菌肽处理后的大肠杆菌、金色葡萄球菌、嗜水气单胞菌的形态结构的变化。结果显示, 经过抗菌肽处理后的细菌形态发生变化, 菌体严重变形, 表面变得粗糙, 出现皱褶, 胞膜破裂。对草鱼肠道抗菌肽的理化性质的研究结果显示, 草鱼肠道抗菌肽具有很好的热稳定性, 耐胰蛋白酶特性。

关键词: 肠道抗菌肽; 扫描电子显微镜; 草鱼; 理化性质

中图分类号: S965.112 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0069-04

Effects of antimicrobial peptide from intestine of grass carp on morphology of bacteria and its physicochemical properties

HUANG Ping^{1a}, CHEN Tao^{1b,2}, PENG Kuan^{1b}, HUANG Xiao-xi^{1b}, ZHANG Huai-yun^{1b*}, ZHANG Dong-yi^{1b,3*}

(1. a.College of Life Science and Technology; b. The Biotechnology Core Facility, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2.College of Veterinarian, HNAU, Changsha 410128, China; 3.Institute of Biotechnology, Changsha College, Changsha 410003, China)

Abstract: Morphological changes of bacteria, *E.coli*, *S.aureus*, *A.hydrophila*, treated with antimicrobial peptide were observed by scanning electron microscopy. The results showed that the cells deformed severely, the surface of bacteria became rough and rumpy, and the cytomembrane was ruptured after treated by antimicrobial peptide from intestine of grass carp. Moreover, research on its physicochemical properties showed antimicrobial peptide from the intestine of grass carp had an excellent thermal stability and strong resistance to trypsin activity.

Key words: antimicrobial peptide of intestine; SEM; grass carp; physicochemical properties

抗菌肽具有广谱抗菌和热稳定性, 一些肽类在 100 °C 下加热 10~15 min, 仍能保持其良好的抗菌活性^[1]。多数抗菌肽的等电点在 8.9~10.7, 表现出较强的阳离子特性, 对较大的离子强度和 pH 值均具有较强的耐受性^[2]。此外, 部分抗菌肽能够耐胰蛋白酶或胃蛋白酶水解, 某些抗菌肽对真菌^[3]、原虫^[4]、病毒^[5]及癌细胞^[6]等均具有一定的杀伤作用。目前已发现的抗菌肽广泛存在于细菌、真菌、昆虫、被囊动物、甲壳动物、鱼类、两栖动物、鸟类、哺乳动物以及包括植物在内的所有生命中。抗菌

肽在饲料加工业及养殖业中的应用将给人类带来无公害绿色鱼、肉禽类产品。将抗菌肽基因导入养殖品中表达, 使其在遇到病原菌入侵等外界环境刺激时自动表达抗菌肽防御。笔者对草鱼肠道抗菌肽对细菌形态结构的影响进行了研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

用 SephadexLH-20, RP-HPLC 等分离技术, 从

收稿日期: 2009-09-08

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年基金项目(08B036); 中南林业科技大学青年科学基金项目(2008013B)

作者简介: 黄平(1983-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事动物生物化学和分子生物学研究; *通讯作者, dongyizhang

@yahoo.com.cn

草鱼肠道分离出的抗菌肽冻干样品；大肠杆菌、金色葡萄球菌、嗜水气单胞菌来自湖南农业大学动物医学院基础兽医实验室；胰蛋白酶 trypsin (Worthington) 购自上海生工生物技术有限公司；RP-HPLC 药品均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽处理后细菌的电镜观察

按照谢家仪等^[7]的方法进行扫描电镜样品的制作和观察。将大肠杆菌、金色葡萄球菌、嗜水气单胞菌 37 °C 培养至菌液 $OD_{600}=0.8$ ，取 100 μL 菌液加入抗菌肽样品 50 μL ，充分混匀后于 37 °C 条件下振荡孵育 20 min，将细菌悬液于 8 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 1 mL 2.5% 戊二醛固定液，充分固定 4 h，8 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 PBS 工作液 1 mL，重复洗涤 3 次，弃去上清液。分别用 30%、50%、70%、85%、95% 酒精进行梯度脱水，每次 20 min，8 000 r/min 离心 5 min，再用 100% 酒精脱水 2 次，每次 20 min。将样品进行临界点干燥，上样，真空喷金，扫描电镜观察并照相。

1.2.2 蛋白酶对抗菌肽作用的影响

将冻干的蛋白质溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH8.0)，并加入少量的 Tween-20，防止酶切后蛋白质吸附在 Eppendorf 管壁。天然蛋白质按 1:1(质量比)加入 1 mg/mL Trypsin，设置空白对照，37 °C，16 h，酶切消化。消化完成后，置于冰上减慢反应速度，进行 RP-HPLC 分析。RP-HPLC 条件：色谱柱为岛津-ODS-C18，上样体积为 100 μL ，Buffer A 为 0.1% TFA/H₂O，Buffer B 为 0.1% TFA/ACN，洗脱梯度为 Buffer B 浓度(5%，5 min；21%，5 min；21%~28%，20 min；95%，5 min；0%，5 min)，流速为 0.6 mL/min，温度为 25 °C。

Trypsin 酶切后经 RP-HPLC 收集样品，利用滤纸片扩散法检测抗菌肽活性，CK1 用无菌去离子水，CK2 用 Trypsin 酶切液。

1.2.3 不同温度对抗菌肽活性的影响

取纯化的草鱼小肠抗菌肽 100 μL 分装于 5 个离心管中，取其中 4 管，分别在 40、60、80、100 °C 条件下孵育热处理 30 min，冰浴冷却，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，对 *E.coli* 作抑菌试验，以无

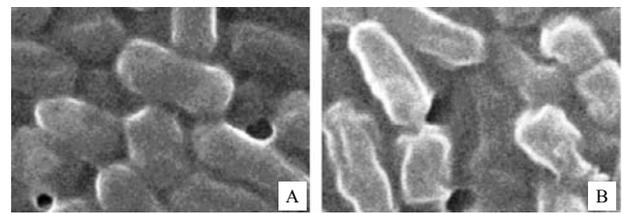
菌水和未处理的抗菌肽样品为空白对照。

2 结果与分析

2.1 草鱼肠道抗菌肽对细菌形态结构变化的影响

2.1.1 对大肠杆菌形态结构的影响

在扫描电镜下，正常大肠杆菌呈短小棒状，直径约 1 μm ，长约 1.8~2.5 μm ，外观饱满，表面光滑，菌体完整(图 1-A)。大肠杆菌与草鱼肠道抗菌肽在 37 °C 条件下作用 30 min 后，细菌表面粗糙、皱缩、干瘪、无饱满感、严重变形(图 1-B)。



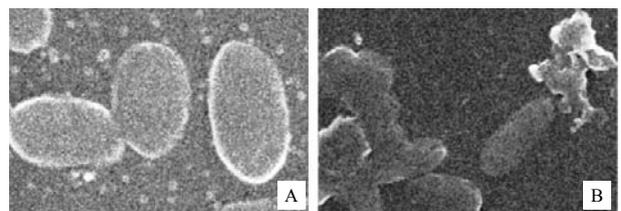
A 正常大肠杆菌；B 抗菌肽处理后的大肠杆菌。

图 1 大肠杆菌扫描电镜观察结果

Fig.1 Scanning electron micrograph showing of *E. coli*

2.1.2 对金色葡萄球菌形态结构的影响

在扫描电镜下，正常金色葡萄球菌为圆球结构，饱满，直径约 1 μm ，排列成葡萄状(图 2-A)。金色葡萄球菌与草鱼肠道抗菌肽在 37 °C 条件下作用 30 min 后，细菌形态发生了变化，菌体皱缩，细菌细胞膜结构出现皱褶，菌体发生破裂(图 2-B)。



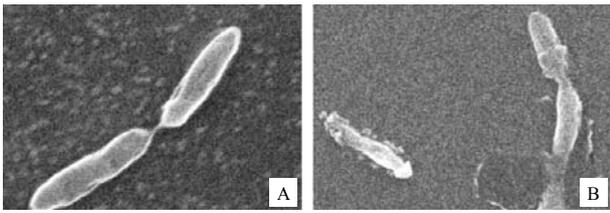
A 正常金色葡萄球菌；B 抗菌肽处理后的金色葡萄球菌。

图 2 金色葡萄球菌扫描电镜观察结果

Fig.2 Scanning electron micrograph showing of *S. aureus*

2.1.3 对嗜水气单胞菌形态结构的影响

在扫描电镜下，正常的嗜水气单胞菌为短杆状结构，菌体饱满，无皱褶出现(图 3-A)。当嗜水气单胞菌与草鱼肠道抗菌肽在 37 °C 条件下作用 30 min 后，细菌形态发生了变化，细菌菌体出现皱褶，细菌两极呈火柴头状(图 3-B)。



A 正常嗜水气单胞菌；B 抗菌肽处理后的嗜水气单胞菌。

图 3 嗜水气单胞菌扫描电镜观察结果

Fig.3 Scanning electron micrograph showing of *A. hydrophila*

2.2 蛋白酶对抗菌肽作用的影响

草鱼肠道抗菌肽经 37 °C 胰蛋白酶酶切 16 h 后，经过 RP-HPLC 回收样品，草鱼肠道抗菌肽的保留时间在 13.0 min 左右(图 4)。空白酶切体系(对照)，草鱼肠道抗菌肽在 ODS-C18 柱中的保留时间没有明显的变化(图 5)。同时，抑菌试验结果显示，酶切后样品对大肠杆菌具有很好的抑菌活性(图 6)。

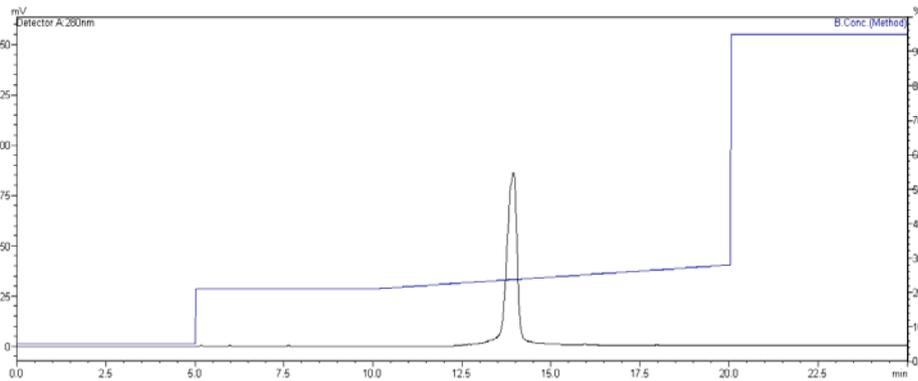


图 4 Trypsin 酶切后抗菌肽的保留时间

Fig.4 Retention time of antimicrobial peptide digested by Trypsin

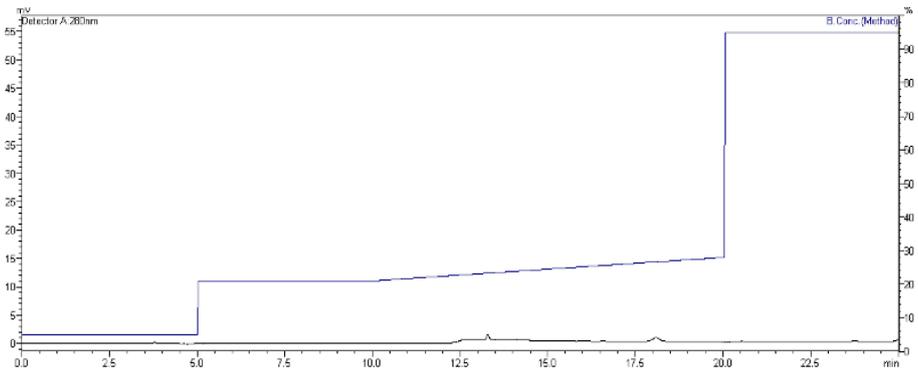


图 5 Trypsin 酶切后对照的保留时间

Fig.5 Retention time of the control of antimicrobial peptide digested by Trypsin

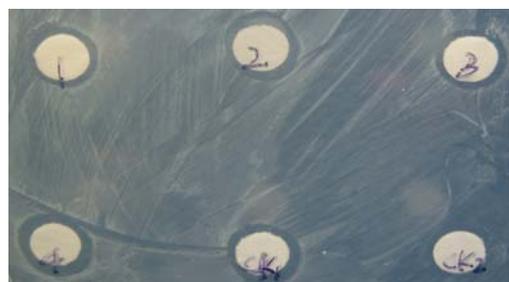


CK1 ddH₂O；CK2 Trypsin 酶切空白；右下角为酶切后样品抑菌圈。

图 6 Trypsin 酶切后抗菌肽样品的抑菌效果

Fig.6 Anti-*E.coli* activity of antimicrobial peptide digested by Trypsin

处理 30 min，依然能保持良好的抑菌活性(图 7)。



1~4 分别为 40、60、80、100 °C 处理后抗菌肽；CK1 未处理抗菌肽；CK2 去离子水。

图 7 不同温度处理抗菌肽样品的抑菌效果

Fig.7 Anti-*E.coli* activity of antimicrobial peptide treated by different temperature

2.3 不同温度对抗菌肽活性的影响

草鱼肠道抗菌肽分别在 40、60、80、100 °C 下

3 讨论

苏建明等^[8]利用柱层析方法,从草鱼肠道中分离到了具有抗菌活性的多肽类物质,但对其理化特性没有作进一步研究.笔者对抗菌肽处理后的细菌显微观察的结果显示,草鱼肠道抗菌肽处理后的3种细菌(大肠杆菌、金色葡萄球菌、嗜水气单胞菌),细胞膜均不同程度出现变形、皱褶,进而导致细胞破裂,这与马卫明等^[9]从猪小肠提取抗菌肽,观察抗菌肽对细菌形态的影响的结果有一定的相似性,初步推断可能是该抗菌肽直接作用于细胞质膜的缘故.有研究^[10]表明,抗菌肽一般的作用机制是阴阳离子作用,阳离子抗菌肽分子与组成细胞膜带负电的磷脂分子结合,扰乱磷脂双分子结构,抗菌肽分子插入细胞膜内部,进一步导致细胞膜破损.草鱼肠道抗菌肽的作用机制目前尚不清楚,还有待进一步研究.本试验结果表明,草鱼肠道抗菌肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌都有很强的杀灭作用.此外,草鱼肠道抗菌肽具有良好的热稳定性,耐胰蛋白酶的特性,可能与其自身的结构有关^[11],其具体结构还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties :Biosynthesis ,structure ,function and applications [J]. *Biotechnology Advance* , 2003 , 21(6) : 465-499.
- [2] Zasloff M . Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature* , 2002 , 415(6870) : 389-390 .
- [3] Ekengren S , Hultmark D. *Drosophila cecropin* as an antifungal agent[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 1999 , 29(11) : 965-972.
- [4] Efron L , Dagan A , Gaidukov L , et al. Direct interaction of dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific anti-parasitic activity in culture[J]. *Biological Chemistry* , 2002 , 277(27) : 24067-24072.
- [5] Wachinger M , Kleinschmidt A , Winder D , et al. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immune deficiency virus 1 by suppressing viral gene expression[J]. *General Virology* , 1998 , 79(4) : 731-740.
- [6] Yoshinobu Ohsaki , Adi F , Gazdar. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines[J]. *Cancer Research* , 1992 , 52(6) : 3534-3538.
- [7] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 190 .
- [8] 苏建明, 雷红宇, 黄平, 等. 草鱼肠道抗菌肽的提取及体外抑菌效果初步研究[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 35(2): 162-165.
- [9] 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): 56-58.
- [10] Hiromi Sato , Jimmy B . Feix peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides[J] . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* , 2006 , 1758(9) : 1245-1256.
- [11] Bulet P , Dimarcq J L , Hetru C , et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution[J]. *Biological Chemistry* , 1993 , 268(20) : 14893-14897.

责任编辑: 苏爱华
英文编辑: 罗文翠