

论著

中国林蛙 (*Rana chensinensis*) 蛙皮抗菌肽的制备及抗菌作用研究

刘红玉 崔洪斌

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 从中国林蛙的皮肤中,提取纯化具有抗菌活性的多肽物质,并对其进行抑菌活性的研究。方法 用甲醇进行粗提取。对提取的甲醇浓度、甲醇用量、浸提时间和浸提次数,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验,以蛋白含量作为指标,确定最佳提取条件。得到的粗提物经 Sephadex G-75、Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 凝胶过滤进一步分离纯化获得抗菌肽。对抗菌肽进行氨基酸组成分析,采用杯碟法进行抑菌活性研究。结果 提取林蛙抗菌肽的最佳工艺条件:甲醇浓度 80%、甲醇体积为蛙皮重量的 6 倍、提取时间 24 h、提取次数 3 次。提取的粗提物经凝胶过滤后得到抗菌肽。抗菌肽的氨基酸组成中,碱性氨基酸占 22.1%,酸性氨基酸占 13.9%。抗菌肽对细菌的最低抑菌浓度分别为:枯草杆菌 73.25 $\mu\text{g/ml}$,金黄色葡萄球菌 51.75 $\mu\text{g/ml}$,大肠杆菌 51.75 $\mu\text{g/ml}$,铜绿假单胞菌 51.75 $\mu\text{g/ml}$ 。结论 经甲醇提取和凝胶过滤可从中国林蛙皮肤得到抗菌肽,该抗菌肽为碱性多肽,对革兰阳性细菌、革兰阴性细菌均有抑制作用。

关键词:蛙;林;皮肤;肽类;抗菌肽;食品防腐剂

- [4] SHESLOW D, HASSINK S, WALLACE W, et al. The relationship between self-esteem and depression in obese children[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 699: 289-291.
- [5] ERERMIS S, CETIN N, TAMAR M, et al. Is obesity a risk factor for psychopathology among adolescents? [J]. *Pediatr Int*, 2004, 46(3): 296-301.
- [6] LI Y, HU X, MA W, et al. Body image perceptions among Chinese children and adolescents[J]. *Body Image*, 2005, 2: 91-103.
- [7] KOVACS M. The Children's Depression Inventory (CDI) Manual[M]. North Tonawanda, NY: Multi Health Systems Inc; 1992.
- [8] SCHEIDT P, OVERPEEK M D, WYATT W, et al. Adolescents general health and wellbeing. Health and health behavior among young people (WHO policy series: Health policy for children and adolescents, issue 1, 24-38) [R]. Copenhagen: WHO, 2000.
- [9] DANIELS J. Weight and weight concerns: are they associated with reported depressive symptoms in adolescents? [J]. *J Pediatr Health Care*, 2005, 19(1): 33-41.
- [10] ROBERTS R E, CHEN Y W. Depressive symptoms and suicidal ideation among Mexican origin and Anglo adolescents[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1995, 34(1): 81-90.
- [11] ALMQVIST F, KUMPULAINEN K, IKAHEIMO K, et al. Behavioural and emotional symptoms in 8-9-year-old children[J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 1999, 8 (Suppl 4): 7-16.
- [12] CANALS J, MARTI-HENNEBERG C, FERNANDEZ-BALLART J, et al. A longitudinal study of depression in an urban Spanish pubertal population[J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 1995, 4(2): 102-111.
- [13] CHARMAN T, PERVOVA I. Self-reported depressed mood in Russian and U. K. schoolchildren. A research note [J]. *J Child Psychol Psychiatry*, 1996, 37(7): 879-883.
- [14] DAVANZO P, KERWIN L, NIKORE V, et al. Spanish translation and reliability testing of the Child Depression Inventory [J]. *Child Psychiatry Hum Dev*, 2004, 35(1): 75-92.
- [15] FRIGERIO A, PESENTI S, MOLTENI M, et al. Depressive symptoms as measured by the CDI in a population of northern Italian children[J]. *Eur Psychiatry*, 2001, 16(1): 33-37.
- [16] NOLEN-HOEKSEMA S, GIRGUS J S, SELIGMAN M E. Predictors and consequences of childhood depressive symptoms: a 5-year longitudinal study[J]. *J Abnorm Psychol*, 1992, 101(3): 405-422.
- [17] TWENGE J M, NOLEN-HOEKSEMA S. Age, gender, race, socioeconomic status, and birth cohort differences on the children's depression inventory: a meta-analysis[J]. *J Abnorm Psychol*, 2002, 111(4): 578-588.
- [18] BRAET C, TANGHE A, BODE P D, et al. Inpatient treatment of obese children: a multicomponent programme without stringent calorie restriction[J]. *Eur J Pediatr*, 2003, 162(6): 391-396.
- [19] SACHER P M, CHADWICK P, WELLS J C, et al. Assessing the acceptability and feasibility of the MEND Programme in a small group of obese 7-11-year-old children[J]. *J Hum Nutr Diet*, 2005, 18(1): 3-5.
- [20] WALKER L L, GATELY P J, BEWICK B M, et al. Children's weight-loss camps: psychological benefit or jeopardy? [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(6): 748-754.

[收稿日期:2007-01-29]

中图分类号:R15;R749.94 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)03-0214-04

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511142)

作者简介:刘红玉 女 硕士生

通讯作者:崔洪斌 男 教授

Preparation of Antibiotic Peptide from Skin of *Rana Chensinensis* and Study of Its Antibacterial Activity

LIU Hong-yu, CUI Hong-bin

(Harbin Medical University, Heilongjiang Harbin 150086, China)

Abstract: Objective To isolate the antimicrobial peptide (AMP) from the skin of *Rana Chensinensis* and study the antibacterial activity of the AMP. **Method** A crude extract was obtained first by methylalcohol extraction. The extraction conditions concentration and volume of methylalcohol, extraction time and extraction frequency were optimized by using the $L_9(3^4)$ orthogonal design. The protein concentration was used as the index. The crude extract was eluted on Sephadex G-75, Sephadex G-50 and Sephadex G-25 chromatographic columns. The amino acid composition of the AMP was analyzed and the antibacterial activity of the AMP was studied by cup method. **Results** For extracting AMP, the optimum concentration of methyl alcohol was 80%, the optimum volume was 6 times the skin weight of *Rana Chensinensis*, the extraction time was 24 h and the extraction frequency was 3 times. AMP was obtained by sephadex gel filtration. Basic amino acid was 22.1% and acidic amino acid was 13.9% in the composition of the AMP. The minimal inhibitory concentration (MIC) of AMP on *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was 73.25 $\mu\text{g/ml}$, on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was 51.75 $\mu\text{g/ml}$, on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 was 51.75 $\mu\text{g/ml}$, and on *Escherichia coli* ATCC 259221 was 51.75 $\mu\text{g/ml}$. **Conclusion** The AMP can be obtained by extraction with methyl alcohol and sephadex gel filtration from the skin of *Rana Chensinensis*. It is a basic polypeptide, having antimicrobial activity against both G^+ and G^- bacteria.

Key word: *Rana temporaria*; Skin; Peptides; Antimicrobial Pdyptide; Food Preservatives

近年来,随着人们对食品安全的日益关注,对生物防腐剂的开发已引起人们的重视。作为生物防腐剂之一的抗菌肽更是因其所具有的独特性质,而成为了研究的热点。抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)是指广泛存在于生物体内,具有抵御外界微生物侵害,消除体内突变细胞的一类小分子多肽。在动物的免疫细胞、空腔脏器粘膜、皮肤及植物中都广泛存在^[1]。抗菌肽具有广谱杀菌作用。

两栖类动物生活在温暖湿润、微生物复杂的环境中,其皮肤裸露、潮湿,为微生物提供了极好的生存环境。研究发现,在长期的进化过程中,两栖类动物靠其皮肤分泌大量的抗菌肽来抵御外来微生物的侵袭^[2-4]。

本研究以黑龙江省林区普遍分布的中国林蛙(*Rana Chensinensis*)为原料,分离提纯其皮肤中的抗菌肽并对其抑菌作用进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

中国林蛙(*Rana chensinensis*),黑龙江大通生物科技有限公司提供。

枯草杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442)和大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 259221)均由黑龙江大学生命科学学院提供。

营养琼脂培养基、LB(Luria - Bertani)培养基。

葡聚糖凝胶 Sephadex G-75、Sephadex G-50、

Sephadex G-25(Pharmacia 公司产品),其他试剂均为国产分析纯。

日立 L8800 氨基酸分析仪。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 取林蛙数只,断头,冰浴条件下迅速剥皮,剪碎,弃去血水,以蛙皮重量 6 倍体积的 80% 甲醇在 4℃ 浸提 24 h,过滤,收集滤液,再浸提 24 h,过滤,共浸提 3 次,合并 3 次所得滤液。将浸提后的蛙皮在 80% 甲醇中 8 000 r/min 匀浆 20 min,再 10 000 r/min 低温(4℃)离心 30 min,取上清液。离心后的蛙皮于玻璃匀浆器中再次细匀浆,低温(4℃) 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液。合并各步所得提取液,浓缩,冷冻干燥。冻干粉用去离子水溶解,用 Bradford 法^[6]测定蛋白含量。

1.2.2 分离 Sephadex G-75 层析分离,1 cm × 60 cm 层析柱,以最佳提取工艺制得的冻干粉,用 2 ml 去离子水溶解后上柱,0.5% 甲醇洗脱,流速为 0.2 ml/min,每 10 min 收集 1 管,在波长 280 nm 处测各管紫外吸光值,收集各洗脱峰。冷冻干燥后,以枯草杆菌为指示菌采用杯碟法^[7]进行抑菌试验。出现抑菌圈的洗脱峰含有具抑菌作用的抗菌肽。

为进一步纯化,将装有 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 的两根层析柱(均为 1 cm × 60 cm)连接起来,将上述具有抑菌作用的冻干粉用 2ml 去离子水溶解后上柱。0.5% 甲醇洗脱,流速为 0.1 ml/min,每 10 min 收集 1 管,在波长 280 nm 处测各管紫外吸光值,收集各洗脱峰,冷冻干燥后以枯草杆菌为指示菌采用杯碟法进行抑菌试验。有抑菌作用的

峰含有抗菌肽,该洗脱峰冻干粉即为制备的中国林蛙蛙皮抗菌肽。

1.2.3 抗菌活性的研究 采用杯碟法^[7]研究抗菌活性,以枯草杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为指示菌进行抑菌试验。枯草杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的培养基为营养琼脂培养基,大肠杆菌的培养基为 LB (Luria-Bertani) 培养基,分别注入加热融化的 20% 琼脂溶液 20 ml 于平皿中作为底层,使其在皿底内均匀摊布。凝固后,在平皿中等距离均匀放入已消毒的牛津杯 4 个。分别另取培养基 30 ml 加热融化后,加入 4 ml 菌悬液,摇匀,使其在底层上均匀摊布,为菌层。取出牛津杯。第一个牛津杯孔中加入 0.5% 甲醇 110 μl,其余牛津杯孔中采用二倍稀释法加入试样液,37℃ 培养 24 h,观察抑菌圈大小。抑菌圈达到 10 mm 的试样浓度为最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。

1.2.4 氨基酸组成分析 采用日立 L8800 氨基酸分析仪测定。

2 结果

2.1 提取工艺的确定 在单因素实验的基础上,对 4 个主要影响因素:甲醇的浓度 X_1 ; 甲醇的用量(蛙皮重量的体积倍数) X_2 ; 浸提时间(h) X_3 ; 浸提次数 X_4 , 利用 $L_9(3^4)$ 做正交实验^[5], 设计表如表 1 所示。

表 1 四因素三水平表

水平	X_1	X_2	X_3	X_4
1	75%	4	24	2
2	80%	5	27	3
3	85%	6	30	4

注: X_1 甲醇的浓度, X_2 甲醇的用量, X_3 浸提时间 h, X_4 浸提次数。

以蛋白含量(μg/ml)作为指标,对制得的试样进行测定。测定结果如表 2 所示。通过分析得出对蛋白含量影响最大的是甲醇浓度和提取次数,其次是提取时间,而甲醇用量影响最小。由表 2 确定最佳的提取工艺为:甲醇浓度 80%、甲醇体积为蛙皮重量的 6 倍、提取时间 24 h、提取次数 3 次。对已选定的最佳工艺条件进行重复试验,获得的粗提物的颜色为淡黄色,蛋白含量为 4 917 μg/ml。

2.2 抗菌肽的分离纯化 提取制得的粗提物经 Sephadex G-75 层析柱分离后,在波长 280 nm 处测定紫外吸光值,进行抑菌试验,抗菌肽在图中所示的活性峰中。收集此活性峰,冻干。

为使试样得到进一步纯化,将收集的冻干粉用去离子水融化后,再经 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 层析,获得层析图谱,如图 2 所示。通过抑菌

试验,得知抗菌肽在图中所示的活性峰中,收集此活性峰,冻干,得到中国林蛙蛙皮抗菌肽。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交设计试验结果

实验号	X_1	X_2	X_3	X_4	Y
1	1	1	1	1	3317
2	1	2	2	2	3189
3	1	3	3	3	2607
4	2	1	2	3	3403
5	2	2	3	1	4364
6	2	3	1	2	4904
7	3	1	3	2	3801
8	3	2	1	3	3440
9	3	3	2	1	3239
K_1	9112	10520	11661	10920	
K_2	12672	10994	9831	11894	
K_3	10480	10750	10771	9450	
k_1	3037	3507	3887	3640	
k_2	4224	3665	3278	3965	
k_3	3493	3683	3590	3150	
极差 R	1187	177	609	815	
优水平	$X_{(2)}$	$X_{(3)}$	$X_{(1)}$	$X_{(2)}$	

注: X_1 甲醇的浓度, X_2 甲醇的用量, X_3 浸提时间 h, X_4 浸提次数。
优水平括号内数字为选择水平。

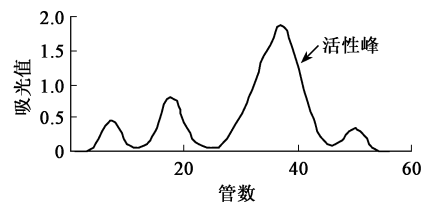


图 1 Sephadex G-75 凝胶过滤图

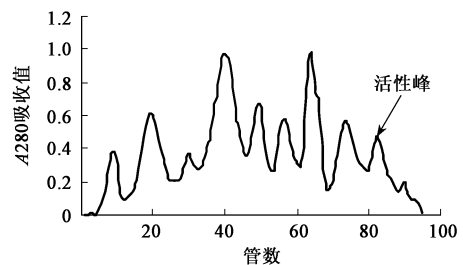
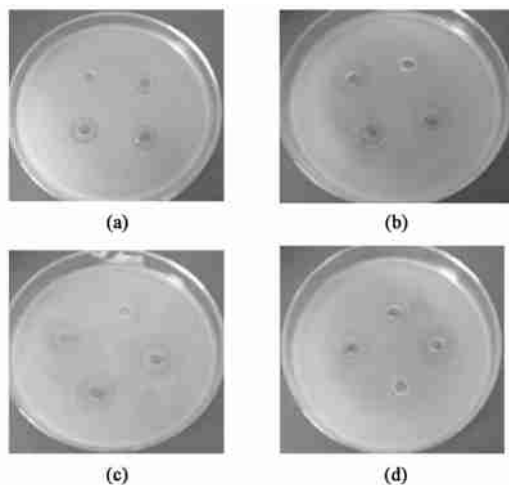


图 2 Sephadex G-50 和 Sephadex-25 凝胶过滤图

2.3 林蛙抗菌肽抗菌活性的研究 对分离得到的中国林蛙蛙皮抗菌肽进行抑菌试验,结果如图 3 所示。可见中国林蛙蛙皮抗菌肽对革兰阳性菌(G^+): 枯草杆菌、金黄色葡萄球菌,革兰阴性菌(G^-)的大肠杆菌、铜绿假单胞菌都有抑菌活性。最低抑菌浓度(MIC)见表 3。



(a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomonas aeruginosa*,
(c) *Bacillus subtilis*, (d) *Staphylococcus aureus*

图3 抑菌试验

表3 抗菌肽的最低抑菌浓度(MIC)

菌名	MIC (µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	73.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	51.75
<i>Escherichia coli</i>	51.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51.75

2.4 氨基酸组成分析 将分离纯化的抗菌肽酸水解后进行氨基酸组成分析,利用氨基酸自动分析仪进行测定,结果见表4。

表4 中国林蛙蛙皮抗菌肽氨基酸组成分析

氨基酸	含量(%)
Asp(天门冬氨酸)	8.0
Thr(苏氨酸)	3.9
Ser(丝氨酸)	4.5
Gu(谷氨酸)	5.9
Gly(甘氨酸)	15.4
Ala(丙氨酸)	8.7
Cys(半胱氨酸)	-
Val(缬氨酸)	4.6
Met(蛋氨酸)	2.0
Ile(异亮氨酸)	3.9
Leu(亮氨酸)	5.7
Tyr(酪氨酸)	0.8
Phe(苯丙氨酸)	2.5
Lys(赖氨酸)	7.1
His(组氨酸)	9.1
Trp(色氨酸)	1.3
Arg(精氨酸)	5.9
Pro(脯氨酸)	10.7
Total(氨基酸总量)	100.0

注: - 为未检出。

从表4中可以看出,在中国林蛙蛙皮抗菌肽氨基酸组成中,碱性氨基酸占氨基酸总量的22.1%,酸性氨基酸占氨基酸总量的13.9%,为碱性多肽。

3 讨论

3.1 提取多肽的方法主要有有机溶剂提取法、水提法和有机酸浸提法。研究表明^[8],两栖类动物皮肤活性多肽多为碱性多肽。为了保持其生物活性,避免多肽遇酸变性,本试验采用有机溶剂提取法。我们对分离得到的中国林蛙蛙皮抗菌肽进行氨基酸组成分析,表明其为碱性多肽,这与研究资料相符。

3.2 由于粗提物是盐类、分子量大小不等的蛋白质及其它小分子的混合物,通过 Sephadex G-75、Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 柱层析,将各组分分开,可以得到具有抑菌效果的中国林蛙蛙皮抗菌肽。由于酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸具有紫外吸收特性,在280 nm处有最大吸收值,大多数蛋白质都具有这些氨基酸,所以蛋白质在280 nm处也有特征吸收,故而在凝胶过滤中我们选择在280 nm处测定紫外吸收值。

3.3 抑菌试验结果表明,中国林蛙抗菌肽对革兰阳性细菌、革兰阴性细菌均有抑制作用。Clarke等人^[9]对两栖类动物的皮肤多肽进行了大量研究,结果表明:两栖类动物的皮肤活性肽具有两亲的α-螺旋结构,一端为亲水端,一端为疏水端,并借助其N-端与C-端间连接结构的柔性,使抗菌肽分子的C-端即疏水端插入质膜中,在质膜上形成跨膜离子通道,使微生物不能形成跨膜电势差,从而造成氧化磷酸化去偶联,并使细胞内内容物质外泄,最终导致细胞死亡。

3.4 抗菌肽具有广谱高效的抗菌活性,同时对某些真菌也有强大杀伤力^[10]。不仅如此,目前已有实验表明,一些抗菌肽对许多癌细胞株也表现出很强的杀伤力,但对正常细胞无损伤^[11,12]。可见,抗菌肽无论是作为一种新型食品防腐剂,还是一种新型抗生素和抗癌制剂,均具有巨大的研究开发价值。

参考文献

[1] HOFFMANN J A, KAFATOS F C, JANEWAY C A, et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. Science, 1999, 284: 1313-1318.

[2] SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us?[J]. Biopolymers, 1998, 47(6): 435-450.

[3] HANCOCK R E W, CHAPPLE D S. Peptide antibiotics [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999, 43(6): 1317-1323.

[4] ZASLOFF M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and

论著

中国食源性鼠伤寒沙门菌株耐药谱及 PFGE 分型研究

周正 刘秀梅

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 了解掌握中国食品中鼠伤寒沙门菌的耐药状况,并对 2002 - 2005 年国家食源性疾病监测网分离的 23 株鼠伤寒沙门菌进行耐药性监测及 PFGE 分型研究。方法 利用血清学方法对 2002 - 2005 年食源性疾病监测网分离的沙门菌进行分型,并运用 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 推荐的纸片法对鼠伤寒沙门菌株进行耐药性检测,采用脉冲场凝胶电泳法(PFGE)进行 PFGE 分型。结果 发现 15 株多重耐药鼠伤寒沙门菌,其中耐 4~5 种抗生素的 6 株(40%),耐 6~9 种抗生素的 5 株(33.3%),耐 10 种抗生素的 4 株(26.7%);可分为 16 个 PFGE 型,其中 5 个 PFGE 型的菌株数超过 1 株。结论 我国食源性鼠伤寒沙门菌分离株的多重耐药性严重,PFGE 分型方法对鼠伤寒沙门菌的分型能力较好,同一 PFGE 型菌株的耐药谱非常接近。

关键词:沙门菌;鼠伤寒;抗药性;微生物;电泳;凝胶;脉冲场

**Antimicrobial Resistance Patterning and Molecular Typing for Isolates of
Foodborne Salmonella typhimurium in China**

ZHOU Zheng, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial resistance of *S. typhimurium* isolates from food in China, the twenty-three strains of *S. typhimurium* isolated from 2002 to 2005 within the areas of Chinese National Foodborne Diseases Surveillance Network were tested for the antimicrobial resistance and molecular types. **Methods** All the strains were detected the antimicrobial resistance by the disk diffusion method and molecular typed by PFGE. **Results** Fifteen out of 23 strains were multiple antimicrobial resistant. Six strains (40%) were resisted to four to five kinds of antibiotics, five strains (33.3%) to six to nine kinds, four strains (26.7%) to ten. All the tested strains were typed into sixteen genotype, with the five genotypes have more than one strains. **Conclusion** The multiple microbial resistance of foodborne *S. typhimurium* strains has showing the prevalent problem. PFGE is one of the good typing methods for *S. typhimurium* isolates. It is also indicated that the results of the antimicrobial resistance patterns are quite closed to the PFGE typing in this study.

Key word: Salmonella typhimurium; Drug Resistance, Microbial; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field

- partial cDNA sequence of precursor [J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5449-5452.
- [5] 金万浩. 食物物性学[M]. 北京:中国科学技术出版社,1991.
- [6] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [7] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1985.
- [8] CHIA B C, CARVER J A, MULHERN T D, et al Maculatin an antimicrobial peptides from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata* solution structure and biological activity [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267: 1894-1908.
- [9] CLARKE B T. The natural history of an amphibian skin secretions, their normal function and potential medical applications[J]. Biol Rew, 1997, 72 (3): 365-379.
- [10] SHERMAN R A, HALL M J, THOMAS S. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions [J]. Annu Rev Entomol, 2000, 45: 55-81.
- [11] BRAHMACHARY M, KRISHNAN S P, KOH J L Y, et al. ANTIMIC: a database of anti-microbial sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1): D586-D589.
- [12] Prates M V, SFORCA M L, REGIS W C. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *hyla punctata*[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (13): 13018-13022.

[收稿日期:2006-10-29]

中图分类号:R15;TS202.3;S966.35 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)03-0217-05

基金项目:公共卫生突发应急反应机制运行专项(食源性疾病监测)

作者简介:周正 男 博士生

通讯作者:刘秀梅 女 研究员