

中国林蛙皮抗菌肽提取条件的优化研究

金莉莉, 丁忠福, 王秋雨*
(辽宁大学生命科学学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘要: 本研究以林蛙干皮为原料, 采用甲醇、乙酸和磷酸盐三种浸提液提取有抑菌活性的多肽, 并分别以提取温度、时间、液料比、pH 值四因素对每种浸提液的提取方法进行三水平正交试验, 以进一步精纯后产物的抑菌活力为指标, 探索林蛙抗菌肽的最优分离纯化工艺。结果表明, 三种浸提液的最优条件分别是: 甲醇法为浸提时间 24h、温度 0℃、液料比为 22.5(W/V)、pH5.4; 乙酸法为 24h、0℃、液料比 22.5、pH3.0; 磷酸盐法为 24h、20℃、液料比 22.5、pH6.4。其中甲醇法浸提产物的抑菌活性最佳, 粗提品经 G-25 层析后, 活力提高了 5 倍, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用。

关键词: 中国林蛙; 抗菌肽; 分离纯化; 抑菌活性

Optimization of Extraction Conditions for Antimicrobial Peptides from Skin of *Rana chensinensis*

JIN Li-li, DING Zhong-fu, WANG Qiu-yu*
(College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: In this study, methanol, acetic acid and phosphate solution were used for extracting antimicrobial peptides from dry skin of *Rana chensinensis* respectively. For the three extraction processes, the important process parameters such as temperature, time, extraction solution to material ratio and pH were optimized respectively by using orthogonal test $L_9(3^4)$ with antibacterial activity of the purified product as test index. The results showed that the optimal conditions of the methanol extraction method are 0℃, 24 h, extraction solution to material ratio 22.5:1, and pH 5.4; For the acetic acid extraction method, they are 0℃, 24 h, extraction solution to material ratio 22.5:1, and pH 3.0; For the phosphate solution extraction method, they are 20℃, 24 h, extraction solution to material ratio 22.5:1, and pH6.4. Among the three methods, the antibacterial activity of the extract obtained by the methanol extraction method is the highest. The specific antibacterial activity is increased by about 5 times through Sephadex G-25 chromatography. The purified product has some antibacterial effects against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Key words: *Rana chensinensis*; antimicrobial peptides; purification; antimicrobial activity

中图分类号: Q516

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0223-05

抗菌肽是生物体内经诱导产生的一类具有生物活性的小分子多肽, 存在于多种生物体中, 是宿主免疫防御系统的一个重要组成部分。抗菌肽具有广谱的抗菌作用, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌均有显著抑制作用^[1-3]。由于抗菌肽是通过干扰原核细胞膜结构导致质膜通透性增大, 从而引起抑菌或杀菌作用, 病原体不易对其产生抗药性, 这使其成为新一代抑菌药物的首选研究对象^[4]。邱芳萍等的研究工作显示, 抗菌肽在食品保鲜等方面也有着广阔的应用前景^[5]。

多年来, 中国林蛙的输卵管(俗称哈士蟆油)被视为

软黄金, 在药用和食用保健等方面已得到广泛应用。目前, 东北地区年产林蛙 10 亿余只, 大量的蛙皮尚未被有效的开发应用。林蛙皮肤湿润、裸露, 为抵御环境有害因子侵袭, 在自然选择的过程中, 经长期进化, 其皮肤分泌液中含有大量具有防御功能的抗菌活性物质。关于林蛙皮抗菌肽的分离纯化研究, 国内虽已见袁德云、邱芳萍等的研究报道^[6-7], 但针对最大限度保存抗菌肽活性和得率的提取工艺优化研究尚未见报道。本实验综合考虑林蛙皮抗菌肽分离提取的常用试剂和影响因素, 设计正交试验, 以期筛选得到具有最佳抑菌活力

收稿日期: 2008-06-03

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学研究计划项目(05L149)

作者简介: 金莉莉(1971-), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事生理生化研究。E-mail: lilijin@lnu.edu.cn

* 通讯作者: 王秋雨(1961-), 男, 教授, 主要从事分子生物学研究。E-mail: qiuyuwan@lnu.edu.cn

和得率的林蛙皮抗菌肽分离纯化工艺, 为其在食品保鲜等领域的开发利用奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

取林蛙油后的中国林蛙干品由辽宁宏宇生物科技有限责任公司提供, 产自辽宁西丰。

大肠杆菌(*Escherichia coli* JM109)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为本实验室保存菌株。

Sephadex G-50、Sephadex G-25 Pharmacia 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 林蛙皮制备

从取林蛙油后干燥的中国林蛙个体上剥取蛙皮, 尽量除去肌肉等杂质, 用剪刀将林蛙干皮剪碎, 备用。

1.2.2 林蛙皮抗菌肽提取工艺

1.2.2.1 林蛙皮浸提正交试验设计

借鉴已有的林蛙抗菌肽提取工艺, 考虑常用浸提液及浸提时间、温度、液料比、pH 值四个因素对抗菌肽提取的影响, 设计四因素三水平的正交试验(表 1)。

表 1 林蛙皮抗菌肽浸提正交试验因素水平表

Table 1 Factor and levels of orthogonal test on extraction of antimicrobial peptides from skin of *Rana chensinensis*

水平	因素					
	A 时间(h)	B 温度(℃)	C 液料比(W/V)	D pH		
				乙酸	磷酸盐	甲醇
1	12	0	15	3.0	5.4	4.4
2	24	4	22.5	4.0	6.4	5.4
3	36	20	30	5.0	6.8	6.4

1.2.2.2 林蛙皮抗菌肽的粗提

依据正交试验的设计条件, 将剪碎的林蛙皮浸于相应的溶液中, 匀速搅拌, 双层纱布过滤, 12000r/min 离心 30min, 0.45 μm 滤膜过滤, 浸提液浓缩冷冻干燥, G-50 凝胶柱层析, 收集活性峰, 冷冻干燥得到林蛙抗菌肽粗品。

1.2.2.3 林蛙抗菌肽粗品的纯化

将 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 分别装入两根层析柱, 串联连接, 并注意使两根柱子连接处保持最小的柱外体积。将冻干粗品分别用 pH 值为 5.1 的乙酸缓冲液(乙酸法)、pH 值为 6.4 的磷酸缓冲液(磷酸盐法)、0.5% 甲醇(甲醇法)溶解, 12000 r/min 离心 30min, 取 0.5ml 上样, 流速 2.7ml/10min, 分别用对应的溶解液洗脱, 用 SBSI100 自动部分接收器收集, 每 10min 收集 1 管。用紫外检测仪在波长 280nm 处测紫外吸收, 收集洗脱

峰, 冻干得到抗菌肽精品。

1.2.3 Bradford 法测蛋白质含量^[8]

配制 0~100 μg/ml 牛血清白蛋白溶液, 绘制标准曲线。于抗菌肽精品溶液 0.1ml 中加入 5ml 的考马斯亮蓝试剂, 振荡混合后放置 10min, 于 595nm 测吸光度, 并通过回归方程计算蛋白质浓度。

1.2.4 林蛙皮抗菌肽抗菌活性测定

分别采用平板活菌计数法和杯碟法研究多肽的抗菌活性。

1.2.4.1 平板计数法

以大肠杆菌为受试菌, 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 恒温培养 24h。将提取的冻干品用 1ml 蒸馏水溶解, 取 100 μl, 加 30 μl LB 培养基和 70 μl 菌液(菌液浓度为 5×10^3 CFU/ml)在离心管中混匀, 37 °C、150r/min 摇床孵育 1h, 取 100 μl 涂平板, 37 °C 培养过夜, 计菌落数, 并计算抑菌率。以蒸馏水为对照组, 每组做三个平行实验。根据公式(1)计算其抑菌活力大小:

$$U^2 = (D - S) / D \quad (1)$$

式中, U^2 为抑菌活力; D 为对照组菌落数; S 为实验组菌落数。

1.2.4.2 杯碟法

以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为受试菌, 菌体培养同上。取 100 μl 菌液(菌液浓度为 1×10^6 CFU/ml)涂平板, 于牛津杯中加 150 μl 抗菌肽溶液, 37 °C 培养 18h, 根据抑菌圈判定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽提取条件的优化

表 2 甲醇法正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test on methanol method

组号	A	B	C	D	抑菌率(%)	抑菌活力(%)
1	1	1	1	1	48.91	69.94
2	1	2	2	2	76.20	87.29
3	1	3	3	3	39.83	63.11
4	2	1	2	3	88.05	93.83
5	2	2	3	1	71.25	84.41
6	2	3	1	2	69.69	83.48
7	3	1	3	2	65.33	80.83
8	3	2	1	3	44.67	66.84
9	3	3	2	1	67.30	82.04
T ₁	220.34	244.60	220.26	236.39		
T ₂	261.72	238.54	263.16	251.60		
T ₃	229.71	228.63	228.35	223.78		
K ₁	73.45	81.53	73.42	78.80		
K ₂	87.24	79.51	87.72	83.87		
K ₃	76.57	76.21	76.15	74.59		
R	13.79	5.32	14.30	9.28		
优水平	A ₂	B ₁	C ₂	D ₂		

注: T_n, K_n 分别表示活力之和及其平均数; R 表示因素的极差。下同。

表3 乙酸法正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test on acetic acid method

组号	A	B	C	D	抑菌率(%)	抑菌活力(%)
1	1	1	1	1	68.91	76.75
2	1	2	2	2	62.20	78.87
3	1	3	3	3	25.83	50.82
4	2	1	2	3	60.05	77.49
5	2	2	3	1	79.25	89.02
6	2	3	1	2	61.69	78.54
7	3	1	3	2	48.33	69.52
8	3	2	1	3	24.67	49.67
9	3	3	2	1	44.30	66.56
T ₁	208.44	223.76	204.96	232.33		
T ₂	239.05	217.56	222.92	226.93		
T ₃	185.75	195.92	209.36	177.98		
K ₁	69.48	74.59	68.32	77.44		
K ₂	79.68	72.52	74.31	75.64		
K ₃	61.92	65.31	69.79	59.33		
R	17.76	9.28	5.99	18.11		
优水平	A ₂	B ₁	C ₂	D ₁		

表4 磷酸盐法正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test on phosphate solution method

组号	A	B	C	D	抑菌率(%)	抑菌活力(%)
1	1	1	1	1	33.08	57.51
2	1	2	2	2	76.43	87.42
3	1	3	3	3	47.92	69.22
4	2	1	2	3	69.08	83.11
5	2	2	3	1	71.38	84.49
6	2	3	1	2	84.78	92.08
7	3	1	3	2	53.44	73.10
8	3	2	1	3	37.43	61.18
9	3	3	2	1	81.32	90.17
T ₁	214.16	213.73	210.77	232.17		
T ₂	259.68	233.09	260.72	252.61		
T ₃	224.46	251.48	226.81	213.52		
K ₁	71.39	71.24	70.26	77.39		
K ₂	86.56	77.70	86.91	84.20		
K ₃	74.82	83.83	75.60	71.17		
R	15.17	12.59	16.65	13.03		
优水平	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂		

按照正交试验设计条件, 进行林蛙皮抗菌肽浸提, 每组正交试验提取的粗品用相同体积的溶液溶解, 测定抑菌率和抑菌活力, 结果见表2~4。甲醇法的最佳浸提条件是24 h, 0℃, 液料比为22.5, pH5.4, 液料比和浸提时间影响较大; 乙酸法是24h, 0℃, 液料比为22.5, pH3.0, pH值和浸提时间影响最大; 磷酸盐法是24h, 20℃, 液料比为22.5, pH6.4, 液料比和浸提时间影响最大。

2.2 林蛙皮抗菌肽的粗提结果

将上述三种优化条件下得到的粗提物冻干品于12000r/min离心15min, 除去溶解中不溶物, 上清液经SephadexG-50柱(1.6cm×48cm)层析, 分离得到2个吸收

峰(图1), 抑菌试验表明, 层析图中II峰为活性峰。Bradford法测定蛋白浓度的结果显示, 磷酸盐法粗提的蛋白含量为原料中的8.8%, 乙酸法为6.9%, 甲醇法为5.7%。而甲醇法II峰在层析图所占比例约为85%, 乙酸法II峰约为74%, 磷酸盐法II峰所占比例最少, 约为68%。

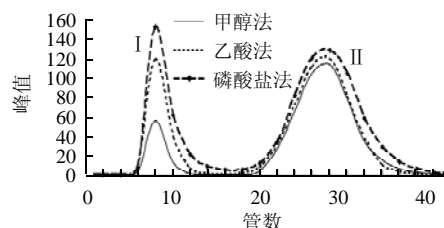


图1 三种浸提液产物的SephadexG-50凝胶层析图谱

Fig.1 Sephadex G-50 gel filtration chromatograms of three extraction methods

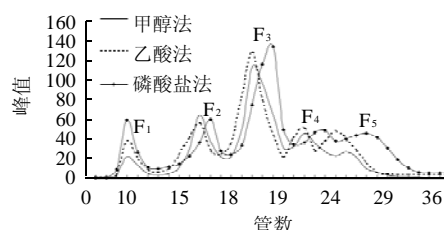


图2 Sephadex G-50和Sephadex G-25串联凝胶层析图谱

Fig.2 Tandem sephadex G-50 with Sephadex G-25 gel filtration chromatograms of three extraction methods

表5 三种优化方法浸提物精制后的抑菌活力比较

Table 5 Comparison among antibacterial activities by three extraction methods

吸收峰	抑菌活力(%)		
	乙酸法	磷酸盐法	80% 甲醇法
F ₁	—	—	—
F ₂	86	79	89
F ₃	7	4	6
F ₄	18	34	34
F ₅	—	—	—

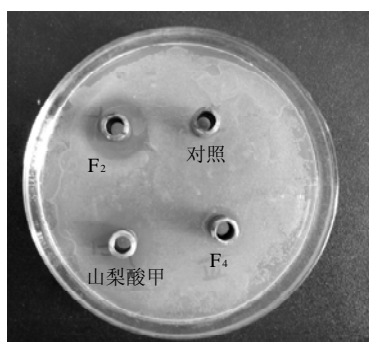
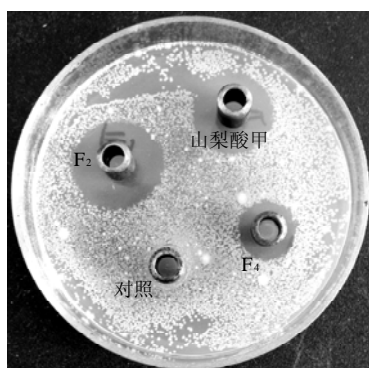
注: “—”表示抑菌活力很弱。

2.3 林蛙皮抗菌肽的精制和抑菌活性

将三组优化条件下得到的抗菌肽粗品经SephadexG-50和SephadexG-25(均为1.2cm×48cm)串联凝胶层析(图2), 分离得到5个吸收峰(F₁、F₂、F₃、F₄、F₅), 经平板法抑菌活性检测, F₂和F₄峰有抑菌活性, 其中F₂峰活性较强, 甲醇法F₂峰活性最高, 达到89%(表5)。采用杯碟法对甲醇法提取的抗菌肽的抑菌性研究表明, F₂和F₄峰对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用, 其中F₂活性较强(图3)。

2.4 甲醇法提取林蛙皮抗菌肽的收率

鉴于甲醇法提取得到的抗菌肽活性最佳, 本实验以

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*图3 抗菌肽 F₂ 和 F₄ 抑菌活性Fig.3 Inhibition zones of antimicrobial peptide F₂ and F₄

Bradford 法测定的蛋白质含量, 计算得到精制后的林蛙皮抗菌肽的收率, 结果见表 6。粗提品经 G-25 与 G-50 串联层析后, 活力提高了约 5 倍。

表 6 甲醇法提取林蛙皮抗菌肽收率
Table 6 Extraction yield by methanol method

批次	蛋白浓度(mg/ml)	抑菌活力(%)	收率(%)
粗提液	2.3	—	5.7
G-50	3.9	76	4.2
G-50+G-25	1.0	92	0.6

注: “—”表示抑菌活力很弱。

3 讨论

天然多肽的提取方法依据提取时所采用的提取液不同, 分为盐溶液提取、酸溶液提取、碱溶液提取和有机溶剂提取等。盐溶液可以增加蛋白的溶解度, 且蛋白不易变性, 酸碱溶液易进入组织细胞, 有机溶剂提取可减少杂质蛋白。已报道的天然抗菌肽的提取溶液多为酸性缓冲液, 王可洲等分别用醋酸缓冲液从兔、大黄鱼、蝇蛆、鳄龟的组织中提取出抗菌肽^[9-12], 而两栖皮肤类抗菌肽如中国林蛙皮肤抗菌肽的提取多见采用酸化的甲醇溶液浸提, 刘红玉等^[13]以 80% 甲醇为浸提液从中国林蛙鲜皮中提得抗菌肽, 仅见田晓乐用磷酸缓冲液

从中国林蛙皮中提得抗菌肽^[14]。未见用碱性溶液提取抗菌肽的报道。抗菌肽抽提多选择酸性溶液, 分析原因可能有三点: 一是酸性溶液易进入组织细胞中, 二是抗菌肽多为碱性蛋白, 在酸性条件下溶解度高, 三是酸性条件可抑制组织中影响抗菌肽活性的内源性蛋白酶的活性^[15]。本研究依据前人的工作基础, 考虑浸提时间、温度、液料比、pH 值对抗菌肽提取的影响, 设计了三因素四水平的正交试验, 以浸提粗品的抑菌活力为指标, 优化得到了每种浸提方法的最佳条件。研究结果显示, 磷酸盐法提取的蛋白含量最多, 但活性峰比例最少, 亦可说明提取的杂质多, 甲醇法提取的蛋白含量最少, 但其活性峰比例最多, 说明提取的杂质少(图 1)。抗菌肽粗品经进一步层析筛选结果同体积条件下, 提取率最少的甲醇法获得的 F₂ 峰活力最高, 其总活力也最高, 而提取率最多的磷酸盐法获得的 F₂ 峰活力最低, 其总活力也最低(表 5)。因此, 从活性和杂蛋白含量角度分析, 优化得到的甲醇法为林蛙皮抗菌肽提取的最佳工艺。

蛋白提取分离工作首先是要选一种周期短且灵敏的检测蛋白活性方法, 平板计数法测多肽的抑菌活性, 相对于抑菌圈法和测吸光度法而言, 结果更加灵敏, 在筛选最佳抗菌肽提取工艺过程中, 提取的多肽用相同体积的溶液溶解, 以抑菌活力大小为指标, 不以比活为参考, 从而正确筛选出总活力最大的提取方法。

蛋白层析方法的选择一般从蛋白的物理和化学性质方面考虑, 由于本研究筛选的是蛋白的提取工艺, 故仅依据所提蛋白的分子量大小选用最简单且不使蛋白变性的凝胶层析进行研究。粗提物经 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 串联凝胶层析分离出 5 个峰, 纯度较高, 活力提高了 5 倍, 其中的 2 峰和 4 峰有抑菌活性, 与邱芳萍等报道的结果相似^[17]。本研究优化得到了林蛙皮抗菌肽的最佳分离条件, 为其开发应用奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] GANZ T, BELLM L, LEHRER R I. Protegrins: new antibiotics of mammalian origin [J]. Expert Opin Investing Drugs, 2000, 9(8): 1731-1742.
- [2] HANCOAK R. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications [J]. Expert Opin Investing Drugs, 2000, 9(8): 1723-1729.
- [3] 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): 586-589.
- [4] TENNESSEN J A, BLOUIN M S. Selection for antimicrobial peptide diversity in frogs leads to gene duplication and low allelic variation[J].

- J Mol Evol, 2007, 65(5): 605-615.
- [5] 邱芳萍, 周杰, 李向晖, 等. 天然食品防腐保鲜剂 - 林蛙皮抗菌肽[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 279-282.
- [6] 袁德云, 王立梅, 胡耀辉. 林蛙皮抗菌肽的提取及其某些特性的测定[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2): 113-116.
- [7] 邱芳萍, 周杰. 林蛙皮抗菌肽的纯化[J]. 长春工业大学学报, 2002, 23(2): 4-6.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 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[J]. 科学技术与工程, 2003(2): 151-154.
- [10] 鄢庆枇, 张俊杰, 邹文政. 溶藻弧菌感染对大黄鱼免疫机能的影响研究[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 250-256.
- [11] 陆婕, 钟雅. 家蝇蛆抗菌肽的提取工艺的研究[J]. 昆虫学报, 2007, 50(2): 106-112.
- [12] 李思明, 欧阳玲. 化鳄龟不同组织抗菌肽粗提物的初步研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(4): 77-78.
- [13] 刘红玉, 崔洪斌. 中国林蛙(*Rana chensinensis*) 蛙皮抗菌肽的制备及抗菌作用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 217-220.
- [14] 田晓乐, 梦庆繁, 王贞佐, 等. 林蛙抗菌肽凝胶剂的制备及抑菌实验[J]. 吉林大学学报: 工学版, 2006, 36(1): 133-136.
- [15] WOODHAMS D C, ROLLINS-SMITH L A, CAREY C, et al. Population trends associated with antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs[M]. Townsviue: Oecologia Press, 2005.