

文章编号: 1674-7054(2010)02-0165-05

哈氏弧菌诱导布氏石斑鱼头肾提取物的抗菌活性研究

陈 诏, 王世锋, 谢珍玉, 于文媛, 周永灿

(海南省热带水生生物技术重点实验室(海南大学); 海南大学 海洋学院 海南 海口 570228)

摘 要: 以致病性哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 腹腔注射布氏石斑鱼(*Epinephelus bleekeri*) 18 h 后, 取布氏石斑鱼头肾制备头肾粗提物, 并对该粗提物的抗菌活性进行研究。结果表明: 布氏石斑鱼经哈氏弧菌诱导后, 其头肾粗提物不仅对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 等革兰氏阳性菌有良好抑制作用, 而且对大肠杆菌 D31(*Escherichia coli* D31)、哈氏弧菌和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 等革兰氏阴性菌也有良好抑制效果; 利用电泳凝胶琼脂糖扩散法检测发现, 头肾粗提物中具有多种对大肠杆菌 D31 有较强作用效果的蛋白类抗菌物质; 切胶回收 AU-PAGE 凝胶上的抗菌组分, 利用 SDS-PAGE 凝胶检测各抗菌活性组分的分子质量大小依次约为: 10.9 KD, 10.0 KD, 8.1 KD, 7.2 KD, 6.3 KD, 由于这些抗菌活性成分可被蛋白酶破坏, 且分子质量均接近或低于 10 KD, 可初步将其认定为抗菌肽。

关键词: 布氏石斑鱼; 头肾; 抗菌肽; 凝胶电泳

中图分类号: S 965.334

文献标志码: A

由于抗生素在水产养殖中的滥用, 水产致病菌的耐药性越来越严重, 研究开发安全高效的新型抗菌药物已成为当前水产病害控制研究的重要方向。近年来, 从多种生物体中发现了一系列具有良好抗菌、抗病毒、抗寄生虫和抗肿瘤等活性的蛋白类物质, 并且, 该类物质还具有对生物体本身无害和不产生耐药性等优点, 现已成为人类和水产新型药物研究的热点^[1-2]。

目前, 从生物体内发现的抗菌肽有上千种, 其中主要来源于陆生生物, 从水生生物中分离的抗菌肽约 200 种^[3]。但已有研究表明, 抗菌肽作为重要的非特异性免疫因子, 其在水生生物中的数量和种类应该比陆生动物更加丰富, 活性也更强^[4]。近年来, 有关鱼类抗菌蛋白类物质的研究越来越多, 已经从不同的鱼类中分离或克隆出多种抗菌蛋白和多肽, 如 piscidin, misgurin 和 hepcidin 等^[1, 5-7]。

石斑鱼是我国南方重要的海水养殖鱼类, 具有较高的经济价值。但近年来, 由于暴发性疾病的影响, 造成海南等地养殖石斑鱼的大量死亡, 经济损失巨大。笔者以布氏石斑鱼(*E. bleekeri*) 为材料, 对其经哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 诱导后的头肾粗提物的抗菌活性物质进行了初步研究, 旨在了解石斑鱼的抗菌蛋白类物质等非特异性免疫因子, 为探索其新型的疾病防治药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 布氏石斑鱼购自海南省海口市板桥海鲜广场, 体质量为 150 ~ 200 g, 在实验室暂养 1 周后, 随机选取健康个体用于实验。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 购自中国科学院微生物研究所; 哈氏弧菌为本实验室分离并保存的致病菌; 大肠杆菌 D31(*Escherichia coli* D31) 为美国北卡罗莱纳州立大学 Noga 教授赠送。

收稿日期: 2010-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(40866002); 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 人事部留学人员科技活动项目; 海南省自然科学基金项目(808117); 海南大学 2009 年度科研项目(hd09xm57)

作者简介: 陈诏(1985-), 女, 江西萍乡人, 海南大学海洋学院 2007 级水产养殖专业硕士研究生。

通信作者: 周永灿(1968-), 男, 江西吉安人, 教授, E-mail: zychnu@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 抗菌物质的诱导 实验组鱼腹腔注射密度为 1.2×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹ 的哈氏弧菌液,注射量为每尾 0.15 mL; 阴性对照组鱼腹腔注射同剂量的灭菌生理盐水; 空白对照组鱼不做任何处理。腹腔注射后,各组鱼分置于水族箱中暂养 16 ~ 18 h,用于提取抗菌活性物质。

1.2.2 头肾粗提物的制备 提取缓冲液的配方: $\varphi = 1\%$ 的醋酸、 $w = 1\%$ 的蛋白酶抑制剂(PMSF)、 $\varphi = 0.9\%$ 的生理盐水。将经哈氏弧菌诱导的布氏石斑鱼以丁香酚麻醉,快速取其头肾放入置于冰上的烧杯中,加入等体积的提取缓冲液,冰浴下研磨,研磨后的混合物 100 °C 水浴 5 min,4 °C 下以 $12\,000$ r $\cdot$ min⁻¹ 离心 90 min,取上清液(头肾粗提物), -80 °C 保存备用。

1.2.3 头肾粗提物抗菌活性分析 采用径向扩散法(Radial Diffusion Assay, RDA)对布氏石斑鱼头肾粗提物进行抗菌活性分析^[5]。具体方法为:将经活化的菌种扩大培养并制备成密度为 10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹ 的菌悬液, LB 固体培养基经高压灭菌后,于 48 ~ 50 °C 的水浴锅中保温,分别取 10 mL 该培养基与 0.1 mL 菌悬液快速混匀后倒平板。待平板冷却凝固后,在无菌条件下,以直径为 2.5 mm 的打孔器在平板上均匀打孔,向孔中加入待测样品,加样量为每孔 5 μ L, 37 °C 培养 18 ~ 24 h,然后测定各样品的抑菌圈直径。

1.2.4 头肾粗提物抗菌活性成分性质分析 取 50 μ L 头肾粗提物和 0.5 μ L 质量浓度为 25 g $\cdot$ L⁻¹ 的蛋白酶 K 混匀, 55 °C 孵育 1 h,然后沸水浴使蛋白酶 K 失活。以 RDA 法检测头肾粗提物经蛋白酶 K 处理前后的抗菌活性,根据其活性变化确定该活性成分是否为蛋白类物质。

1.2.5 电泳凝胶琼脂糖弥散法检测头肾粗提物的抗菌活性成分 LB 固体培养基经高压灭菌后于 48 ~ 50 °C 水浴锅中保温,取 20 mL 该培养基分别与密度为 10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹ 的大肠杆菌 D31 菌悬液 200 μ L 和质量浓度为 10 g $\cdot$ L⁻¹ 的硫酸链霉素 200 μ L 均匀混和后,制备平板,待平板冷却后,进行琼脂糖弥散抗菌试验。

参照 Panyim 方法^[8]制备 1 mm 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶(acid-urea poly-acrylamide gel electrophoresis, AU-PAGE), 150 V 预电泳以除去凝胶中残余的 TEMED 和过硫酸铵,至电流恒定时结束预电泳。将样品与上样缓冲液等体积混合后上样,每孔上样量 30 μ L, 150 V 恒压电泳 1 h。分别取出电泳后的 2 块凝胶,其中一块用考马斯亮蓝 G-250 染色以显示样品组分;另一块凝胶经 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 PBS 洗涤 3 次(每次 10 min)后,将其平铺于上述已制备好的含菌 LB 平板上,在平板底面用油性笔标出凝胶四周边界, 37 °C 孵育 3 h 后取出凝胶,再 37 °C 孵育 15 ~ 21 h,检测记录平板上抑菌斑的位置。

1.2.6 分子质量测定 按照 1.2.5 的方法进行 AU-PAGE 电泳,电泳结束后,切取其中一条泳道的凝胶进行考马斯亮蓝 G-250 染色,并将染色的凝胶与未染色的凝胶进行对比,切取未染色凝胶中含有抗菌活性物质的部分,将其放入玻璃研磨器中,加入等体积的 $\varphi = 1\%$ 的醋酸进行研磨匀浆。匀浆混合物 4 °C 浸提过夜, 4 °C $12\,000$ r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取上清液置于截留分子质量为 3 500 Da 的超滤离心管中, 4 °C $5\,000$ r $\cdot$ min⁻¹ 离心,将该上清液浓缩至原液的 1/10,浓缩液 -80 °C 保存备用。

参照 Laemmli 的方法^[9]进行 SDS-PAGE(denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)。分离胶、浓缩胶分别为 $w = 15\%$ 和 $w = 3.9\%$ 的丙烯酰胺凝胶,厚度为 1 mm,电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸溶液。将样品与 5 倍样品量的上样缓冲液混合后上样,每孔上样 30 μ L。90 V 恒压电泳约 10 min,当样品进入分离胶时,电压升至 120 V 直到电泳结束。凝胶经考马斯亮蓝 G-250 染色后,再以银染方法复染^[10]。根据凝胶中标准蛋白质迁移速率构建函数,计算抗菌活性组分的分子质量。

2 结果

2.1 布氏石斑鱼头肾粗提物的抗菌活性 布氏石斑鱼经哈氏弧菌诱导 16 ~ 18 h 后,其头肾粗提物对大肠杆菌 D31、金黄色葡萄球菌、哈氏弧菌和溶藻弧菌都有不同程度的抑制效果(图 1),抑菌圈直径依次分别为 8.5 mm、7.0 mm、6.0 mm、6.0 mm,说明该粗提物含有广谱抗菌活性的物质。空白对照组和阴性对照组的头肾粗提物也有一定抑菌活性,但明显弱于经哈氏弧菌诱导的实验组(图 1)。实验组头肾粗提物经蛋白酶 K 水解处理 1 h 后,对各种实验菌的抑菌活性均完全消失(图 2),说明该粗提物中所含的抗菌活性成分为蛋白类物质。

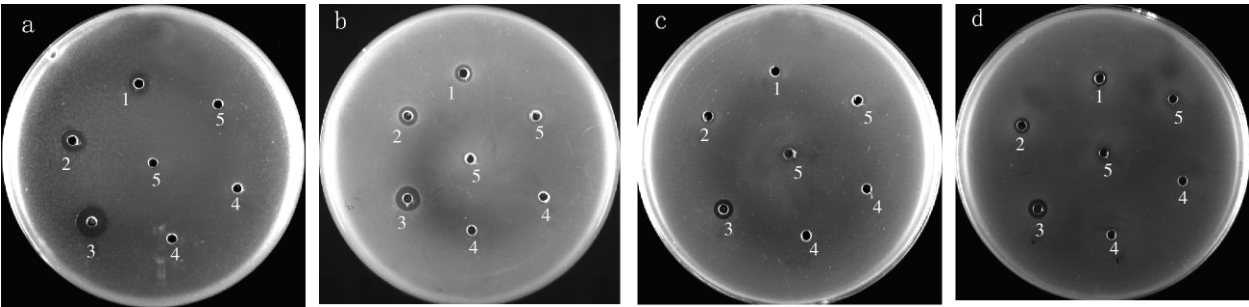


图 1 布氏石斑鱼头肾粗提物的抗菌活性

a. 大肠杆菌; b. 哈氏弧菌; c. 金黄色葡萄球菌; d. 溶藻弧菌

1. 空白对照组; 2. 阴性对照组(注射生理盐水); 3. 实验组(注射哈氏弧菌); 4. $\varphi = 1\%$ 的醋酸; 5. 灭菌生理盐水

2.2 电泳凝胶琼脂糖弥散法分析头肾粗提取物中抗菌活性 布氏石斑鱼头肾粗提取物经 AU-PAGE 和考马斯亮蓝染色的结果表明(图 2), 该粗提取物中含有多种蛋白类成分。该粗提取物经 AU-GAGE 的凝胶以 PBS 洗涤后, 进行弥散抗菌试验的结果表明, 在该粗提取物中泳动速率较快的 5 条蛋白质电泳条带(条带 a~e)的位置有明显的抑菌斑, 说明条带 a~e 对大肠杆菌 D31 有明显的抑菌活性, 是粗提取物中主要的抗菌活性成分。

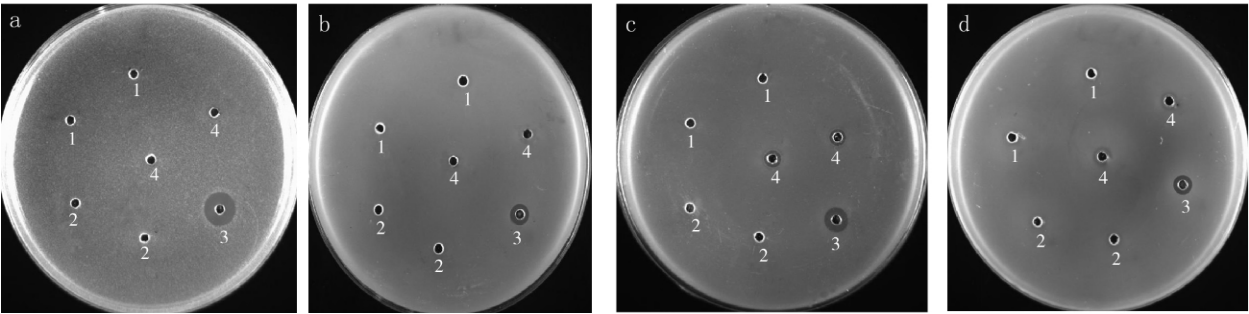


图 2 蛋白酶 K 处理前后布氏石斑鱼头肾粗提物的抗菌活性

a. 大肠杆菌; b. 金黄色葡萄球菌; c. 哈氏弧菌; d. 溶藻弧菌

1. 蛋白酶 K 处理后的头肾粗提取物; 2. 灭菌生理盐水; 3. 未做蛋白酶 K 处理的头肾粗提取物; 4. $\varphi = 1\%$ 的醋酸

2.3 抗菌活性成分的分子质量测定 切胶回收 AU-PAGE 凝胶中具有抑菌活性的组分, 利用超滤离心管浓缩并经 SDS-PAGE 电泳检测结果表明(图 3) 布氏石斑鱼头肾粗提取物中具有抗菌活性的 5 条电泳条带(图 3 中的条带 a~e)与标准蛋白的相对迁移率(Rf)比较计算后, 测得这些蛋白类条带的分子质量从大到小依次分别约为: 10.9 KD, 10.0 KD, 8.1 KD, 7.2 KD 和 6.3 KD, 均属于抗菌肽。

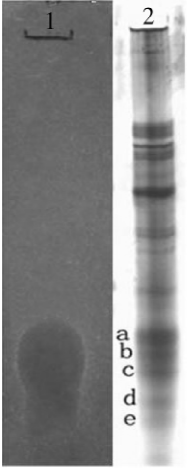


图 3 布氏石斑鱼头肾粗提取物 AU-PAGE 电泳图谱

1. 琼脂糖弥散法测定抑菌活性区(*E. coli*); 2. 头肾粗提取物 AU-PAGE 电泳条带(条带 a~e 为对应的抗菌活性区)

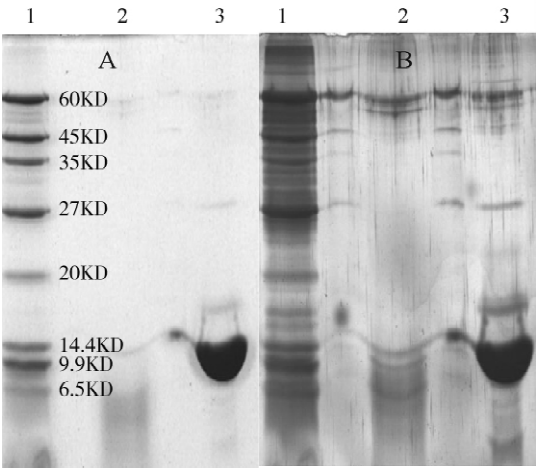


图 4 布氏石斑鱼头肾粗提取物 SDS-PAGE 图谱

A. 考马斯亮蓝 G-250 染色; B. 银染复染
1. 标准分子质量蛋白; 2. 抗菌活性成分凝胶回收样品; 3. $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶菌酶

3 讨 论

与其他动物抗菌肽研究相比,鱼类抗菌肽研究起步较晚,但已有研究表明,鱼类含有丰富的具有良好抗菌、抗病毒、抗寄生虫和抗肿瘤等活性的蛋白类成分^[4-6],这些成分不仅是其自身非常重要的非特异性免疫因子,而且通过开展相关研究还可为探索新型人类和畜禽病害控制药物奠定良好基础^[2,11]。

头肾是鱼类重要的免疫器官,含有丰富的免疫物质,是提取鱼类抗菌蛋白和抗菌多肽较为理想的组织。在海水鱼类早期发育过程中,头肾是免疫器官中出现最早的组织,其不仅是特异性免疫防御系统中产生抗体的器官,而且是非特异性免疫防御系统中免疫细胞和体液免疫因子的生发中心^[12-13]。现代分子生物学研究表明,虽然鱼类的鳃、皮肤、粘液、头肾、肝脏、肠道、脾脏、肾脏、脑、血液、心脏等多种组织器官均可表达分泌抗菌肽^[7,14],但鱼类头肾抗菌肽的表达量要显著高于其他绝大多数组织。如杂交条纹鲈(*Hybrid striped*)经链球菌 *Streptococcus iniae* 刺激后,抗菌肽 Moronecidin 在各组织中的表达量以头肾最高;金头鲷(*Sparus aurata*)抗菌肽 hepcidin 表达量最高的部位为头肾和脾脏,远高于其他组织^[15]。

石斑鱼是热带和亚热带地区的名贵海水养殖鱼类,但有关其抗菌肽等抗菌蛋白类物质的研究并不多。科研工作者利用基因克隆的方法获得了斜带石斑鱼(*E. coioides*)的 Epinecidin-1、青石斑鱼(*E. awoara*)的 Hepcidin 和赤点石斑鱼(*E. akaara*)的 piscidin-like^[8,16-17],其中,斜带石斑鱼 Epinecidin-1 的分子质量为 2 985.63 Da;赤点石斑鱼来自脾脏和头肾的 piscidin-like 的分子质量分别约为 3 441.15 Da 和 3 476.11 Da;青石斑鱼 Hepcidin 的分子质量约为 2 465.8 Da^[8,16-17]。在从石斑鱼直接分离抗菌肽研究方面,目前仅张英霞等从鲑点石斑鱼(*E. trimaculatus*)皮肤中分离到一种分子量约为 41 KD 的抗菌活性蛋白^[18]。李建民^[19]等对已分离、鉴定出的 750 余种不同抗菌肽分子质量进行分析,发现已报道的绝大多数抗菌肽的相对分子质量均小于 10 KD,也有少量抗菌肽的分子质量稍大于 10 KD。笔者从布氏石斑鱼头肾中分离的 5 种抗菌活性物质的分子质量分别为:10.9 KD,10.0 KD,8.1 KD,7.2 KD 和 6.3 KD,其分子质量均接近或低于 10 KD,而且,这些抗菌活性成分均可被蛋白酶破坏,可初步将其认定为抗菌肽。

笔者获得的这些抗菌肽与石斑鱼中已报道的抗菌肽或抗菌蛋白均分子质量明显不同,很可能是一些新的抗菌肽,并且,笔者从布氏石斑鱼头肾中初步分离的这些抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较好的作用效果,具有良好的研究前景。

参考文献:

- [1] OREN Z, SHAI Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 237: 303–310.
- [2] PAN C Y, CHEN J Y, NI I H. *et al.* Organization and promoter analysis of the grouper (*Epinephelus coioides*) epinecidin-1 gene [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 2008, 150: 358–367.
- [3] VEGA E, O'LEARY N A, SHOCKEY J E, *et al.* Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei*(LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45: 1916–1925.
- [4] LOFGRENA S E, MILETTIB L C, STEINDEL M, *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals [J]. *Experimental Parasitology* 2008, 118(2): 197–202.
- [5] SILPHADUANG U, NOGA E J. Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish [J]. *Nature*, 2001, 414: 268–269.
- [6] PARK C B, LEE J H, PARK I Y, *et al.* A novel antimicrobial peptide from loach: *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *FEBS letters*, 1997, 411: 173–178.
- [7] CUESTA A, MESEGUER J, ESTEBAN M Á. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream [J]. *Molecular Immunology* 2008, 45: 2333–2342.
- [8] PANYIM S, CHALKLEY R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histone [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1969, 130: 337.

- [9] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. Nature ,1970 ,227: 680 – 685.
- [10] 邵锦震 ,顾勇. 水稻剑叶蛋白质的双向电泳分析 [J]. 湖北师范学院学报: 自然科学版 ,2006 ,26(1) : 1 – 5.
- [11] CHEN J Y ,LIN W J ,LIN T L. A fish antimicrobial peptide ,tilapia hepcidin TH2-3 , shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells [J]. Peptides ,2009 ,30: 1636 – 1642.
- [12] 徐晓津 ,王军 ,谢仰杰 ,等. 大黄鱼头肾免疫细胞研究 [J]. 海洋科学 ,2008 ,32(11) : 24 – 28.
- [13] 徐晓津 ,翁朝红 ,王军 ,等. 大黄鱼早期发育过程中免疫器官的发生 [J]. 海洋学报 ,2007 ,29(3) : 105 – 113.
- [14] LIU F ,LI J L ,YUE G H , *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology ,2010 ,133: 133 – 143.
- [15] LAUTH X ,SHIKE H ,BURNS J C , *et al.* Discovery and characterization of two isoforms of morneccidin a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass [J]. The journal of biological chemistry. 2002 ,277(7) : 5030 – 5039.
- [16] 邓尚龙. 石斑鱼抗菌肽 Hepcidin 基因的克隆、表达与抗菌活性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学 ,2008.
- [17] 陈勇. 两种海水鱼 piscidin-like 抗菌肽基因的克隆、序列分析及 piscidins 家族系统进化研究 [D]. 厦门: 厦门大学 ,2008.
- [18] 张英霞 ,邹瑗徽 ,满初日嘎 ,等. 鲑点石斑鱼皮肤抗菌活性蛋白的纯化及抗菌活性 [J]. 动物学研究 ,2008 ,29(6) : 627 – 632.
- [19] 李建民 ,周开亚 ,张双全 ,等. 先天免疫中的抗菌肽及其进化 [J]. 南京师范大学学报 ,1999 ,22(抗菌肽专集) : 16 – 33.

Study on the Antibacterial Head & Kidney Extract of *Epinephelus bleekeri* Induced by *Vibrio harveyi*

CHEN Zhao ,WANG Shi-feng ,XIE Zhen-yu ,YU Wen-yuan ,ZHOU Yong-can

(Ocean College , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: The pathogenic *Vibrio harveyi* was intraperitoneal injected to *Epinephelus bleekeri* , and after 18h , the crude extract was prepared from the head-kidney of *E. bleekeri* , and the analysis results of the antibacterial activities of the crude head-kidney extract indicated that the crude head-kidney extract have good antibacterial effects on both G⁺ bacteria and G⁻ bacteria. Radial Diffusion Assay (RDA) in Agarose Gels and Acid-urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (AU-PAGE) methods were used to detect and screen the antibacterial materials , and the data showed that the crude head-kidney extracts contain at least 5 kinds of antibacterial materials with good antibacterial effects on *Escherichia coli* D31 , and all the antibacterial materials were obtained after DNA gel extraction from AU-PAGE gel , whose molecular mass were approximately 10.9 KD , 10.0 KD , 8.1 KD , 7.2 KD and 6.3 KD , respectively. Because the antibacterial materials could be destroyed and their molecular mass was close to or lower than 10 KD , they were preliminarily considered as antibacterial peptides.

Key words: *Epinephelus bleekeri*; Head-kidney; Antibacterial peptide; AU-PAGE