

牡蛎软体中抗菌蛋白的制备及活性研究*

王春波¹ 兰晓明^{1,2} 王洪江¹ 牟茜^{1,2} 孙谧³

(1.青岛大学医学院 青岛 266012; 2.青岛卫生学校 青岛 266071;
3.中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

提要 采用超滤法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、CM-Sepharose FF 阳离子交换柱层析法等对牡蛎软体中抗菌蛋白(Antibacterial protein, AP)进行分离纯化, 并采用体外实验观察其对常见致病菌的抗菌作用。结果表明, 此蛋白分子量在 16.4—39 kDa, 蛋白质含量 70%。抗菌蛋白对生孢梭菌、白色念珠菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌、肠球菌、不动菌属均有较强的抗菌作用, MIC 范围在 0.125—32.0 $\mu\text{g/ml}$ 之间, MBC 范围在 0.250—1.00 mg/ml 之间。以透射电镜观察 AP 对大肠杆菌的作用, 提示 AP 可能通过作用于菌体细胞壁, 发挥其抗菌作用。

关键词 牡蛎软体, 蛋白, 制备, 抗菌作用

中图分类号 R151.41

近年来, 随着海洋生物工程技术的运用, 从海洋生物中获得活性成分成为开发高效、安全药物的重要资源, 也是现代海洋科学研究的新热点。到目前为止, 已经从海藻、海绵、腔肠动物、被囊动物、棘皮动物和微生物体内分离和鉴定了新型化合物 3000 多种, 它们的主要活性表现在抗菌、抗病毒、抗凝血、镇痛、抗炎、抗肿瘤和抗心血管疾病等方面, 其中的部分先导化合物已经进入临床或临床应用(Wallace, 1997)。海洋中的抗菌活性物质主要发现在海绵、海藻、海洋纤毛虫、海洋细菌及贝类等海洋生物中。活性成分主要有蛋白、生物碱、萜类、糖类、脂类和其它含氮类、杂环类化合物等(马海萍等, 2006)。目前国外有 10 多种海洋活性化合物(或类似物)正在临床研究阶段。国内亦已开发了系列头孢菌素、玉足海参渗透剂等海洋抗菌药物。

牡蛎是一种广泛分布于山东、辽宁、河北、海南等省沿海一带的常见海洋贝类生物, 其壳及肉均为传统的中药材。《本草纲目》中记载:“牡蛎肉甘、温无毒, 煮食治虚损, 调中, 解丹毒……。”随着研究的进展, 牡蛎软体即牡蛎肉的应用也逐渐广泛(谭桂利

等, 1993; 王顺年等, 1991; 张冬青等, 1994)。本文中作者报告牡蛎软体中一种活性蛋白的分离纯化及其抗菌作用的研究, 以期为其开发成新型的海洋抗菌药物打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 长牡蛎(*Ostrea gigas* Thunberg)、大连湾牡蛎(*Ostrea talienwhanensis* Grosse)或近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gouid)的肉作为牡蛎原料。蛋清溶菌酶、丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺购自 Sigma 公司, 标准蛋白为中国科学院上海生物化学所产品(14, 21, 43, 64, 97 kDa)。洗必泰: 西北合成药厂生产, 批号: 040206。牛血清白蛋白(250 $\mu\text{g/ml}$); Folin-酚试剂, 由本室自配。需气菌、厌气菌培养基、真菌培养基、营养琼脂均由中国生物制品检定所提供。水解酪蛋白琼脂(MH)培养基: 上海伊华医学科技有限公司生产, 批号: 20030404。营养肉汤: 卫生部上海生物制品研究所生产, 批号: 030203。LB 液体培养基, 为本实验室配制, 其他试剂为国产分析纯试剂。

* 国家 863 计划资助项目, 2003AA625070 号; 山东省科技厅资助项目, 22130107 号。王春波, 教授, 博士研究生导师。

通讯作者: 牟茜, 博士, E-mail: moriamq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-15, 收修改稿日期: 2009-10-10

1.1.2 菌株 溶壁微球菌购自 sigma 公司。生孢梭菌[CMCC(B)64941]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]由中国生物制品检定所提供;金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌、变形杆菌、肠球菌、不动菌属,为山东大学齐鲁医院近期收集的临床分离菌株;金黄色葡萄球菌 JP-04-08、ATCC 25922,铜绿假单胞菌 LN-04-12、ATCC 27853,大肠埃希氏菌 PC-04-21、ATCC 25923,表皮葡萄球菌 BP-04-18,变形杆菌 BX-04-10,为中国药品生物制品检定所提供。质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC 25922、大肠埃希氏菌 ATCC 25923、铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 方法

1.2.1 抗菌蛋白的制备

1.2.1.1 蛋白粗体的制备 取鲜活牡蛎 5—10 kg,以纯化水反复冲洗除去贝壳取牡蛎软体,纯化水、注射用水清洗 3 次沥干水分,得净料称重(500 g),净料经粉碎、低温研磨过 100 目筛,按重量比(w/w)1:1 加入注射用水,在 1—4 ℃ 用搅拌机搅拌提取(6—8 h),匀浆液离心(4000 r/min, 40 min),得蛋白粗体上清液。

1.2.1.2 液体浓缩蛋白的制备 将 1.2.1.1 中获得的上清液采用 SMB220 生物型错流超滤系统分级(膜截留分子量为 50 kDa),再以截留分子量为 10 kDa 的膜浓缩 5 倍。浓缩液密闭存放或制备成冻干粉。

1.2.1.3 蛋白的分离纯化 取超滤浓缩液 2.0ml,上样于 pH 3.8 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液充分平衡后的 CM-Sepharose FF 层析柱(2.5 cm × 10 cm)进行层析,用 200 ml 含 0-1.0 mol/L NaCl 的缓冲液进行线性梯度洗脱,收集活性峰,脱盐浓缩后上样到以 pH 6.5 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液充分平衡的 Sephadex G-100 层析柱(1.6 cm × 60 cm)进行层析,用平衡液进行洗脱,收集活性峰,脱盐浓缩后 -20 ℃ 保存备用。以上纯化操作均在 4 ℃ 进行。

1.2.2 抗菌蛋白性质分析

1.2.2.1 纯度和分子量测定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定,蛋白浓缩液(10 μl, 15 μl)直接上样进行 SDS-PAGE 分析,分离胶浓度为 15%,电泳条件:电压 200 V, 56 min,用 0.5%考马斯亮蓝 R250 染色,使用不同分子量的标准蛋白对抗菌蛋白进行分子量及其分布测试及分析。

采用 SDS-PAGE 方法测定,分离胶浓度为 12%,用 0.5%考马斯亮蓝 R250 染色。将纯化得到的蛋白以

SDS-PAGE 进行分析。

1.2.2.2 含氮量测定 取 3 批次(200305021、20030808、20040411)牡蛎海洋溶菌酶冻干粉按照中华人民共和国药典(2000 年版 二部)附录 D 氮测定法测定。

1.2.3 体外实验

1.2.3.1 MIC(minimum inhibitory concentration, 最低抑菌浓度)测定 采用平皿二倍稀释法和 Denlay 多点接种器进行药敏试验(周世宁等, 1997; Shimizu *et al*, 1998; Wang *et al*, 2003),试验菌用营养肉汤及脑心浸液增菌;抗菌蛋白海洋低温溶菌酶用 MH 肉汤二倍稀释成各种所需浓度,分别加适量至平皿中, MH 琼脂培养基融化后定量注入含药液平皿内混匀,使生孢梭菌最终浓度为 15×10^6 cfu/ml,白色念珠菌最终浓度为 18×10^6 cfu/ml,其他菌液最终浓度为 1×10^5 cfu/ml,需氧菌 37 ℃ 培养 18 h,真菌 20—25 ℃ 培养 48 h,厌氧菌置厌氧孵箱 30—35 ℃ 孵育 48 h 后观察结果,无菌生长的平皿中所含药物最小的浓度即为 MIC。

1.2.3.2 MBC(minimal bacteriocidal concentration, 最低杀菌浓度)测定 采用试管二倍稀释法,先测出试验菌的 MIC,再依次将未见细菌生长各管培养液分别吸取 0.1 ml,转移到不含药液的琼脂平皿中,培养条件同 MIC 测定,观察测定结果,平皿上菌落数 <5 个的最小药物浓度即为 MBC。

1.2.4 透射电镜下观察抗菌蛋白对大肠埃希氏菌超微结构的变化 试验以正常大肠埃希氏菌培养 12 h 制备透射电镜样品作阴性对照组。以 LB 液体培养基将抗菌蛋白稀释成 1.25 mg/ml,加入对数生长期的大肠埃希氏菌,使浓度为 1×10^5 cfu/ml。于摇床中培养(37 min, 200 r/min)12 h,离心弃上清,沉淀用磷酸缓冲液洗涤 3 次,制备透射电镜样品。固定、脱水、切片和染色后,作为实验组(Mc Gregor *et al*, 2000)。透射电镜下观察大肠埃希氏菌超微结构的变化。

2 结果

2.1 抗菌蛋白的分离纯化

抗菌蛋白经 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析分离后,盐洗脱峰为活性峰,洗脱曲线见图 1,收集活性峰浓缩后上样于 Sephadex G-100 凝胶层析柱,洗脱曲线见图 2,第二个峰为活性峰,收集活性峰透析浓缩后作为纯化样品使用。

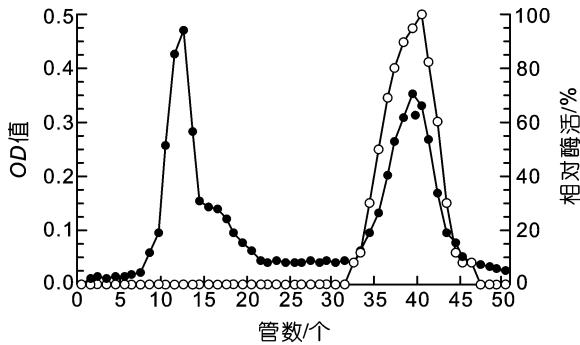


图1 蛋白经 CM-Sepharose FF 阳离子交换层析分离后的洗脱曲线

Fig.1 The elution curve of AP through CM-Sepharose FF cation-exchange chromatography
—●— A280; —○— 相对活性

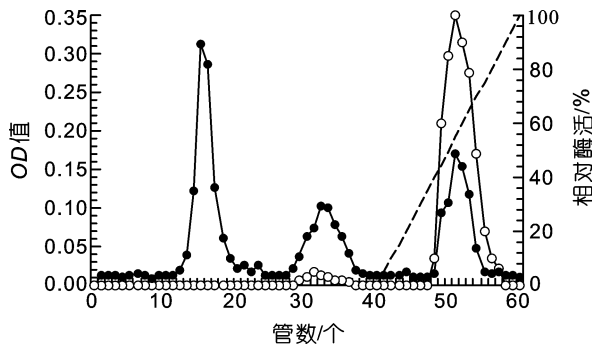


图2 蛋白经 Sephadex G-100 凝胶层析柱层析分离后的洗脱曲线

Fig.2 The elution curve of AP through Sephadex G-100 gel chromatography
—●— A280; —○— 相对活性

2.2 抗菌蛋白性质分析

2.2.1 抗菌蛋白纯度和分子量测定 由图 3a 可见, 牡蛎 - 海洋溶菌酶为含多种蛋白的混合物, 其分子量分布较宽, 从 10 kDa 一直到 100 kDa 都有分布, 其中分子量分布在 15 kDa 和 23 kDa 左右的组分含量较多。

三批牡蛎 - 海洋溶菌酶浓缩液均为多种蛋白的混合物, 其电泳条带相同, 各条带的分布及浓度基本相同, 说明样品制备的重现性良好, 工艺稳定, 产品质量稳定, 见图 3b。

纯化样品为单一条带, 由标准蛋白可知分子量约为 39 kDa, 结果见图 4。

2.2.2 含氮量测定 3 批次(200305021、20030808、20040411)抗菌蛋白冻干粉蛋白含量分别为 78.42%、77.00%、74.84%, 结果见表 1。

2.3 抗菌蛋白对生孢梭菌、白色念珠菌的抗菌作用 抗菌蛋白对生孢梭菌最低抑菌浓度为 0.0156%,

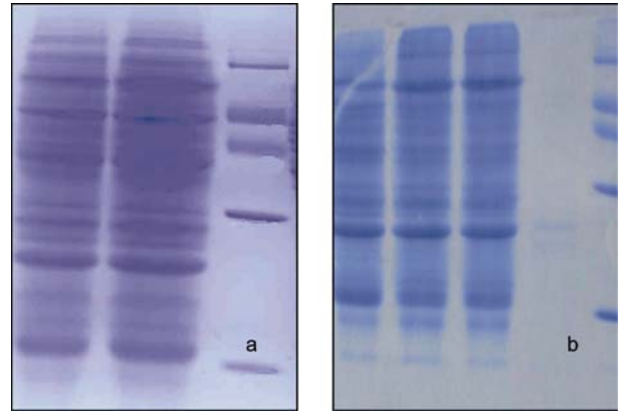


图3 蛋白浓缩液电泳图(图 a 批号: 040213; 图 b 批号: 040216, 040219; 单位 kDa)

Fig.3 The electropherogram of concentrated protein solution [batch number 040213, kDa(a), batch number 040213, 040216, 040219, kDa(b)]

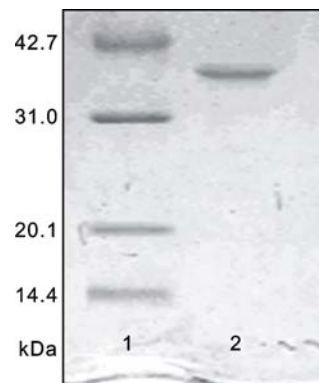


图4 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE spectrum of Antibacterial Protein
1. marker;
2. 纯化蛋白

最低杀菌浓度为 0.0313%; 对白色念珠菌最低抑菌浓度为 0.0625%, 最低杀菌浓度为 0.0625%, 结果见表 2。

2.4 抗菌蛋白对临床常见致病菌和标准质控菌株的抗菌活性

抗菌蛋白对临床常见的致病菌具有良好的抗菌作用且呈剂量依赖性(表 3、表 4)。对 3 株标准质控菌株也有较好的抗菌作用(表 5)。

2.5 抗菌蛋白对大肠杆菌超微结构的作用研究结果

对照组: 正常大肠杆菌形态为直杆状, 细胞壁和细胞膜完整光滑, 结构紧密, 细胞膜紧贴细胞壁, 细胞质均匀。抗菌蛋白(1.25 mg/ml)组, 大肠杆菌的形态发生改变, 随着时间的延长变化越来越明显: 作用 1 h 后, 细胞壁松弛出现皱褶, 菌体变短变粗, 呈椭圆形, 细胞质固缩; 2 h 后, 大部分菌体呈圆球形; 3 h 后, 菌体呈不规则形, 细胞壁缺失, 细胞质解体出现空腔, 菌体裂解(图 5)。

表 1 三批次抗菌蛋白含量测定结果
Tab.1 Contents of three batches of AP

项 目	200305021		20030808		20040411	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
蛋白含量(%)	78.43	78.40	77.01	76.99	74.84	74.84
蛋白含量平均值(%)	78.42		77.00		74.84	

表 2 抗菌蛋白对生孢梭菌与白色念珠菌的抑菌杀菌浓度试验结果

Tab.2 Antibacterial activity of AP on *Clostridium sporogenes* and *Candida albicans*

组别	含量(%)	抗菌作用	
		生孢梭菌	白色念珠菌
AP	1	-	-
	0.5	-	-
	0.25	-	-
	0.125	-	-
	0.0625	-	- ^{①②}
	0.0313	- ^①	+
	0.0156	- ^②	+
	0.0078	+	+
	0.0039	+	+
	0.002	+	+
	0.001	+	+
0.0005	+	+	
洗必泰	-	-	-
对照组	+	+	+

+ 试验管生长; - 试验管未生长; 最低杀菌浓度; 最低抑菌浓度

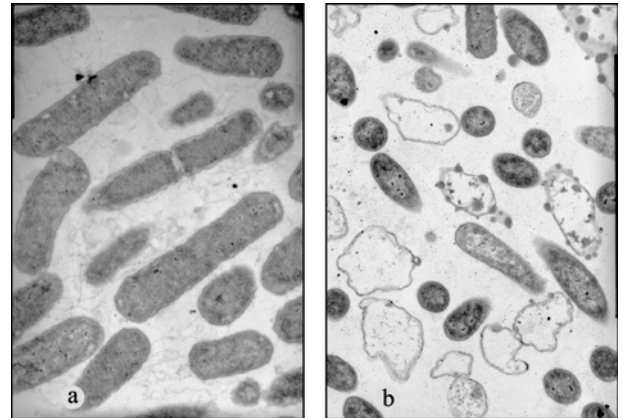


图 5 透射电镜下 AP 对大肠埃希菌 ATCC25922 形态结构的影响

Fig.5 Effect of AP on ultrastructure of *Escherichia coli* shown under an electronic microscope
a.正常培养 12 h 大肠埃希菌($\times 12000$); b.AP 作用 12 h 大肠埃希菌($\times 12000$)

3 讨论

海洋生物种类多、资源丰富,而且其生物活性物质具有独特的化学结构和高活性,为活性化合物的研制开发提供了非常诱人的前景。

表 3 抗菌蛋白常见致病菌的 MIC 测定
Tab.3 MICs of AP on common pathogenic bacteria

细菌	药物	MIC 范围 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
金黄色葡萄球菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.25—16	4	16
	洗必泰	0.5—64	8	16
表皮葡萄球菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.0625—8	1	4
	洗必泰	0.03125—4	1	4
大肠埃希氏菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.125—32	4	32
	洗必泰	2—64	16	64
铜绿假单胞菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.5—32	8	16
	洗必泰	2—64	16	64
变形杆菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.0625—32	2	8
	洗必泰	0.125—32	4	32
肺炎克雷伯杆菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.125—16	2	16
	洗必泰	0.5—32	4	16
不动菌属 (n = 20)	抗菌蛋白	0.25—32	4	32
	洗必泰	0.125—32	4	16
肠球菌 (n = 20)	抗菌蛋白	0.25—16	4	16
	洗必泰	0.25—32	4	16

表 4 抗菌蛋白对 8 株细菌的 MBC 测定
Tab.4 MBCs of AP on eight strains of bacteria

细 菌	菌 号	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
金黄色葡萄球菌	JP-04-08	0.125	0.5
金黄色葡萄球菌	ATCC25922	0.125	0.25
绿脓杆菌	LN-04-12	0.0625	0.25
绿脓杆菌	ATCC27853	0.125	0.5
大肠杆菌	DC-04-21	0.25	0.25
大肠杆菌	ATCC25923	0.25	0.5
表皮葡萄球菌	BP-04-18	0.0625	0.25
普通变形杆菌	BX-04-10	0.25	1

表 5 抗菌蛋白对标准质控菌株的 MIC 测定
Tab.5 MICs of AP on standard strains of bacteria

细 菌	药 物	MIC(μ g/ml)
金黄色葡萄球菌	抗菌蛋白	0.125
(ATCC25922)	洗必泰	0.25
大肠埃希氏菌	抗菌蛋白	0.25
(ATCC25923)	洗必泰	0.125
铜绿假单胞菌	抗菌蛋白	1
(ATCC27853)	洗必泰	0.25

在对牡蛎中蛋白类抗菌物质的研究中, Xue 等(2004)和 Volety 等(2001)自东方牡蛎血浆提取出的溶菌酶(分子量为 18 kDa 左右)单独应用时可产生较强的抗 G^+ 和 G^- 作用, 但未见其对真菌和厌氧菌作用的报道。Mitta 等(1999, 2000), Charlet 等 1996 和 Hubert 等(1996) 从两种贻贝(*Mytilus edulis* 和 *Mytilus galloprovincialis*) 体内分离和纯化出 4 类抗菌肽: 防御素(具有抗革兰氏阳性和阴性菌活性)、贻贝素(对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有活性)、贻贝肽(抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌、贻贝霉素(抗真菌), 抗菌作用主要表现为在抗尖孢镰刀菌属、抗海洋甲壳类病原菌、抗革兰阴性菌如弧菌和双壳贝类病原菌(Destoumieux *et al*, 1997)。巨蛎(*Crassostrea reavirginica*) 及硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*) 中的大分子化合物在体内、体外均显示出抗细菌和抗病毒活性(管华诗等, 2000)。牡蛎软体中抗菌蛋白与上述贝类中抗菌活性物质相比, 具有嗜低温、较稳定及抗菌谱广的特点, 显示了其独特的优势。实验结果显示, AP 对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌可产生强大抗菌作用, 并且对厌氧菌(生孢梭菌)和真菌(白色念珠菌)也有较强的抗菌作用, MIC 范围在 0.12—0.20 μ g/ml 之间, MBC 范围在 0.25—1.0 mg/ml 之间。

根据透射电镜观察 AP 对大肠埃希氏菌细胞壁的结果, 抗菌蛋白 1.25 mg/ml 对大肠埃希氏菌作用 1 h,

细菌细胞壁即松弛并出现皱褶, 细胞质发生固缩, 提示其抗菌蛋白起效较为迅速, 并推测其可能是通过水解细胞壁中的糖苷键, 破坏了细胞壁结构使细胞壁出现部分缺失, 使之失去了对细胞的保护作用, 从而使细胞质解体出现空腔。另外, AP 可能进一步通过渗透进入细胞内, 吸附细胞内带有阴离子的细胞质, 并发生絮凝作用, 扰乱细胞正常的生理活动而杀灭细菌。而人体细胞无细胞壁。AP 对多种不同致病菌的作用还可能与其分子量较大(39 kDa)、为几种相关蛋白的混合物、发挥了协同作用有关。

参 考 文 献

- 马海萍, 梅雪婷, 许实波, 2006. 国外海洋抗菌活性物质的研究进展. 中国海洋药物杂志, 25(3): 46—49
- 王顺年, 松 峰, 张洪亮等, 1991. 牡蛎内有关化学成分的研究. 中国海洋药物, 10(1): 15—17
- 张冬青, 沈伯华, 高 颖等, 1994. 牡蛎提取物对小鼠免疫功能的正向调节作用. 上海免疫学杂志, 15(1): 18—21
- 周世宁, 林永成, 姜广策, 1997. 海洋微生物的生物活性物质研究. 海洋药物, 32(3): 28—30
- 管华诗, 耿美玉, 王长云, 2000. 21 世纪中国的海洋药物. 中国海洋药物, 19(4): 44—47
- 谭桂利, 李瑞声, 1993. 牡蛎的化学成分和药用价值. 中国海洋药物, 12(4): 26—27
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W *et al*, 1998. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulation proton flux. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 1455—1459
- Wang H, Shang L, Hao W, 2003. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. Oncogene, 22(50): 8168—8177
- Mc Gregor J A, French J I, 2000. Bacterial vaginosis in pregnancy. Obstet Gynecol Surv, 55(50): 1405—1408
- Xue Q G, Schey K L, Volety A K *et al*, 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster(*Crassostrea virginica*). Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, 139B(1): 11—25
- Volety A K, Chu F-LE, Cruz-Rodriguez, 2001. Partial purification and characterization of lysozyme-like proteins from the plasma of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Aquaculture 2001:Book of Abstract, 666
- Charlet M, Chernysh S, Philippe H *et al*, 1996. Innate Immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, mytilus edulis. J Biol Chem, Sep. 271: 21808—21813
- Hubert F, Noel T, Roch P, 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Eur J Biochem, 240: 302—306
- Mitta G, Hubert F, Noel T *et al*, 1999. Myticin, a novel cys-

- teine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem*, 265: 71—78
- Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P, 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett*, 486(3): 185—190
- Destoumieux D, Bulet P, Loew D *et al*, 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, 272(45): 28398—28412
- Wallace R W, 1997. Drugs from the sea: harvesting the results of ocean chemical evolution. *Mol Med Today*, 3 (7): 291—295

PREPARATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF OYSTER PROTEIN

WANG Chun-Bo¹, LAN Xiao-Ming^{1,2}, WANG Hong-Jiang¹, MU Qian^{1,2}, SUN Mi³

(1. *Qingdao University Medical College, Qingdao, 266012*; 2. *Qingdao Health School, Qingdao, 266071*;

3. *Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Antibacterial protein (AP) was prepared and purified by means of ultrafiltration technology and CM-Sepharee FF positive ion column chromatography from oyster muscle. The *in vitro* activity of AP was also studied. The AP demonstrated *in vitro* activity against test strains, including *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter*. The MIC range and the MBC range of the AP against these stains was 0.125—32.0 $\mu\text{g/mL}$ and 0.250—1.00 mg/ml, respectively. In addition, after treated with AP, the cell walls of pathogens showed obvious morphologic changes, showing that the effective places of the AP on bacteria were at the cell walls.

Key words Muscle of oyster, Protein, Preparation, Antibacterial activity