

# 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)一种新型抗菌肽的 纯化及其生物学特性研究\*

纪 勇<sup>1</sup> 王晓露<sup>1</sup> 苏永全<sup>2</sup> 覃映雪<sup>1</sup> 邹文政<sup>1</sup>  
邢颜丽<sup>1</sup> 徐晓津<sup>1</sup> 鄢庆枇<sup>1</sup>

(1. 集美大学水产学院 福建省高校水产科学与食品安全重点实验室 厦门 361021;  
2. 厦门大学海洋学系 厦门 361005)

**摘要** 以致病性溶藻弧菌为指示菌,通过酸粗提、固相萃取、Sephadex G-25 柱凝胶层析和 RP-HPLC 等分离纯化技术,从大黄鱼胃肠组织中分离纯化抗菌肽。结果表明,大黄鱼肠道组织中存在着多种抗菌物质,并最终得到一种高纯度的新型抗菌肽 AMP-W3。AMP-W3 由 10 种氨基酸组成,其中天冬氨酸、谷氨酸和甘氨酸的含量较高。AMP-W3 对溶藻弧菌的最低抑菌浓度介于 1.25—2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,对人血红细胞的溶血浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在酸性条件下的抗菌活性更强,对革兰氏阳性细菌,革兰氏阴性细菌以及真菌表现出广谱的抗菌活性。本文是首次从鱼类胃肠组织中分离得到抗菌肽,有助于更全面了解鱼类的抗菌肽及抗感染免疫。

**关键词** 抗菌肽,纯化,生物活性,大黄鱼

**中图分类号** S432.1

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMP)广泛地分布于动植物体内(Zaslo, 2002),具有非特异性广谱抗细菌、真菌和病毒的作用,被认为是宿主防御系统第一防线的一个主要组成(Hancock *et al*, 2000a, b; 邹文政等, 2010)。除了抗菌活性外,某些抗菌肽还含有多种功能,如加快伤口的自愈和促进单核细胞的趋化(Matsuzaki *et al*, 1995)。

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国海水网箱养殖单一产量最高的鱼类(Ma *et al*, 2005)。随着大黄鱼养殖规模的不断扩大,各种传染性疾病日趋严重(Hubert *et al*, 1998; 倪海儿等, 2009)。传统的抗生素和化学药物防治措施造成致病菌耐药性、环境污染和药物残留等问题的不断加剧。虽然疫苗能有效预防某些鱼病,但是其只能对特定病原产生特异性的免疫,而且不能对胞内病原体发挥作用(Kajita *et al*, 1990)。抗菌肽的广谱抗菌活性和不易产生耐药性的特性有

望在今后鱼类疾病防治中发挥重要作用,故而成为近期的研究热点。近年来,已经从多种水生生物特别是鱼类中分离出不同的抗菌肽: misgurin (Park *et al*, 1997)、pleurocidin (Lee *et al*, 1998)、paradoxins (Oren *et al*, 1996)、parasin I (Park *et al*, 1998)等,并对抗菌肽的生物学特性作了较为深入的研究(Gerwick *et al*, 2007)。Zhang 等(2009)从大黄鱼的头、肾组织分离得到一种新型抗菌肽,但是,有关大黄鱼胃肠组织抗菌肽的分离纯化仍未见报道。

本文以大黄鱼致病菌——溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*, ND-01)作为指示菌,利用酸提、固相萃取、Sephadex G-25 和 RP-HPLC 分离、纯化大黄鱼的胃肠组织中的抗菌肽,进而分析其氨基酸组成,测定其抗菌谱和溶血性等生物学特性,旨在分离纯化一种新的抗菌肽,了解抗菌肽在大黄鱼抗感染免疫中的作用。同时,也为大黄鱼的新的广谱疫苗的研发提供一

\* 国家“863”高技术研究发展计划, 2007AA09Z115 号; 农业部公益性行业科研专项, 200903029 号。纪 勇, E-mail: jiyong926@163.com

通讯作者: 鄢庆枇, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-13, 收修改稿日期: 2011-04-29

个新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和实验鱼

病原菌: 致病性溶藻弧菌分离自患病大黄鱼, 经回归感染确定有较强毒性(鄢庆枇等, 2001), 保存于本实验室的 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。该菌株用于整个分离纯化过程的抗菌活性测定。

其它菌株: 奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, ATCC12453)购自美国菌种保藏中心; 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, As.1.879)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, As.1.88)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, As.1.1614)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, As.1.927)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, As.1.90)、黑曲霉(*Aspergillus niger*, As.3.769)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*, As.3.3871)购自中国科学院微生物研究所, 上述菌株用于抗菌谱测定。

50 尾体重 400—500g 的健康大黄鱼购自宁德大黄鱼养殖网箱。

### 1.2 抗菌活性检测

采用改良 Lehrer 等(1991)的琼脂扩散法测定抗菌活性。配制 0.8% (W/V)琼脂, 1/10 营养的 TSA 和  $10^8$  CFU/ml 的菌悬液, 用混血法制成终浓度为  $10^5$  CFU/ml 的平板。冷却凝固后用打孔器在平板上打若干直径为 3mm 的小孔。待测样品(25 $\mu\text{l}$ )加于各小孔,  $4^{\circ}\text{C}$ 培养 3h, 然后  $30^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。抗菌效果用抑菌圈直径(mm)表示。以 50U/ml 的链霉素为阳性对照; 以不含样品的溶剂为阴性对照。

### 1.3 抗菌物质粗提

冷冻的胃肠样品在等体积 10% 醋酸中匀浆 10min, 随后用磁力搅拌器  $4^{\circ}\text{C}$ 过夜搅拌。 $4^{\circ}\text{C}$ 、10000g 离心 20min, 收集上清液, 往沉淀物中加入同等体积的 10% 醋酸, 重复上述搅拌、离心步骤, 收集上清液。合并 2 次收集的上清液, 沸水浴 10min。冷水中退热后,  $4^{\circ}\text{C}$ 、10000g 离心 20min。取上清液冻干、称重, 溶于 500ml 的超纯水(Ultra Purity Water, UPW),  $0.45\mu\text{m}$  滤膜(Millipore)过滤, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。取少量沸水浴前后的提取液经冻干、重溶后测定抗菌活性, 以 UPW 为阴性对照。

### 1.4 固相萃取

粗提样和等体积 0.2%(V/V)的三氟乙酸(TFA)混合后, 上样于经 0.1% TFA 平衡的 Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  柱(Waters 公司)。然后分别用含 0、10%、15%、20%、

25%和 30%乙腈(ACN)的 0.1% TFA 溶液洗脱柱子, 收集各组分的洗脱液, 冻干后分别溶于 200ml 10mmol/L 醋酸铵( $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 6.6), 过滤, 测定蛋白质浓度,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。以 10mmol/L 醋酸铵为阴性对照, 直接测定各组分的抗菌活性。

### 1.5 凝胶过滤

取活性最高的组分, 用 26/370 Sephadex G-25 F 柱(Amersham 公司), 配合 ÄKTA 蛋白纯化仪(GE 公司)进一步分离抗菌活性成分。5.0ml 样品上样于 Sephadex G-25 F 柱, 等基线稳定后用 10mmol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 1ml/min 洗脱, 收集器每 1min 收集一组分, 215nm 处测定吸光度值, 以 10mmol/L 醋酸铵为阴性对照, 直接测定各收集管的抗菌活性和蛋白浓度后, 活性组分于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 1.6 RP-HPLC 纯化

50 $\mu\text{l}$  抗菌组分和 0.2% TFA 等体积混合, 然后用反相高效液相色谱仪(RP-HPLC, Agilent 1100)进一步纯化。100 $\mu\text{l}$  加样至反相  $\text{C}_{18}$  柱(4.6mm  $\times$  250mm, 5 $\mu\text{m}$ , Agilent), 柱温  $30^{\circ}\text{C}$ , A 液为: 0.1% TFA; B 液为: 0.08% TFA, 50% ACN, 1ml/min 三梯度洗脱, 每分钟收集一管, 将各组分冻干, 重溶于 100 $\mu\text{l}$  的 UPW 中。以 UPW 为阴性对照, 测各组分的抗菌活性。

取活性成分进行第二次 RP-HPLC 纯化, 不同梯度洗脱, 其余条件同上。

### 1.7 氨基酸分析

参考 Nagashima 等(2003)的方法, 准确称取活性纯品 0.1mg, 于 10ml 容量瓶中, 加入 10.0ml 6.0mol/L 盐酸, 置液氮中冷冻, 然后抽真空至 7Pa, 封口置于  $(110\pm 1)^{\circ}\text{C}$  恒温干燥箱中水解 24h。冷却、过滤后取 1ml 水解液至上样瓶, 放入 L-8900 全自动氨基酸分析系统(日立)测定, 以 UPW 为空白, 利用标准峰单点外标比较法计算样品含量。

### 1.8 生物学活性测定

**1.8.1 抗菌肽最低抑菌浓度(Minimum Inhibition Concentration, MIC)的测定** 取 RP-HPLC 纯化的样品配制成 40  $\mu\text{g/ml}$  的溶液, 以 1 : 1 倍比稀释 7 次, 采用 1.2 方法测定 AMP-W3 对溶藻弧菌的最低抑菌浓度。

**1.8.2 不同 pH 处理对抗菌肽 AMP-W3 的抑菌活性的影响** 用 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的磷酸盐缓冲液, 配制浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$  的 AMP-W3 粗提液, 按 1.2 检测抑菌活性, 以相应 pH 的磷酸盐缓冲液为对照。设三个重复。

**1.8.3 抗菌谱测定** 采用 1.2 所述琼脂扩散法测定 AMP-W3 对 6 株细菌和 2 株真菌的抗菌效果, 每株菌设三个平行。

### 1.9 溶血性测定

参考 Tincu 等(2003)的方法, 用 pH 7.2 PBS 配制不同浓度(2 倍稀释)的抗菌肽溶液, 加入终浓度为 2.8% (V/V)人血红细胞悬液(采自厦门市第二医院), 不加抗菌肽的红细胞悬液为阴性对照(0% 溶血); 加入 1% Triton X-100 的红细胞悬液为阳性对照(100% 溶血)。将上述溶液在 37℃ 震荡温育 1h 后, 900g, 离心 10min, 测定上清液  $A_{540}$  值, 用下式计算溶血率: 溶血率(%) =  $[(A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})] \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌物质初提

从 50 尾健康大黄鱼解剖分离得到约 250g 胃肠组织, 经酸提, 加热冻干后得到 10.8g 样品, 溶于 500ml 的 UPW 中, 过滤后用考马斯亮蓝法测得粗样的蛋白浓度为 8.2mg/ml。抗菌实验结果显示: 热处理前粗提液的抑菌圈直径为(19±1)mm, 热处理后样品抑菌圈直径为(20±1)mm。

### 2.2 固相萃取

热处理后的活性样品经 Sep-Pak  $C_{18}$  柱分离, 得到 6 个洗脱样品, 实验检测都有一定的抗菌活性, 其中 15% ACN 的洗脱样品的抗菌活性最高, 蛋白质浓度最低。选择 15% ACN 的洗脱样品进行进一步的分离纯化。见图 1。

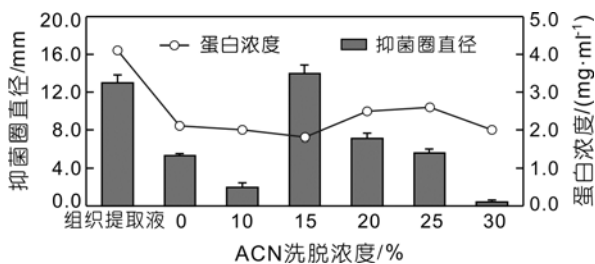


图 1 样品经固相萃取后各组分的抗菌效果和蛋白浓度  
Fig.1 Antimicrobial activity and protein concentration of the different eluates from the solid state extraction

### 2.3 Sephadex G-25 纯化

活性组分(15%ACN)经 Sephadex G-25 柱分离, 波长 215nm 下, 得出三个蛋白峰(XL1、XL2、XL3), 其中 XL2 和 XL3 对溶藻弧菌有明显的抑菌作用, 而

XL1 没有表现出抗菌活性。XL2 和 XL3 的 UV215 图形与其抗菌活性相吻合, 说明 15%ACN 洗脱成分中至少含有 2 种不同的抗菌活性物质。由于第 26 管处于 XL3 的峰顶, 而且其抗菌活性最强, 因此选择 Fr.No.26 进行 RP-HPLC 进一步纯化。在 XL2 和 XL3 之间, 洗脱液的 pH 值急剧下降, 而电导率则出现一个高峰, 说明在该部分的洗脱液中存在极性较强的带酸性的物质。抗菌活性最高的 Fr.No.26 的 pH 值为 4.0, 电导率为 1%, 说明其中的成分带酸性, 且极性较高。

### 2.4 活性样品的 RP-HPLC 纯化

Fr.No.26 经 RP-HPLC 分离后其 UV215 图谱出现较多峰, 其中在 15.8、33.7 和 58.1min 出现 3 个峰(W1、W2 和 W3)具有抗菌活性。由于 W3 的侧峰较少, 且  $OD_{215}$  值较高, 所以取 W3 进入下一步纯化。W3 经二次 RP-HPLC 分离, 在 14.6min 收集到抗菌肽 W3 的单一峰。该峰有些许拖尾, 两侧无杂峰, 可认为此时的 W3 已达到 HPLC 纯, 将其命名为 AMP-W3, 用于生物学特性分析。

### 2.5 AMP-W3 的氨基酸组成

AMP-W3 含有 10 种氨基酸, 其中天冬氨酸、谷氨酸和甘氨酸所占摩尔数比约为 15%, 缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸含量约为 10%, 丙氨酸、苏氨酸和异亮氨酸等 3 种氨基酸的含量在 5% 左右(图 2)。

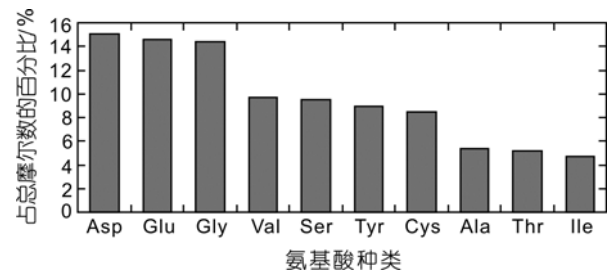


图 2 AMP-W3 的组成氨基酸组成(占总摩尔数的比例%)  
Fig.2 Amino acid composition of AMP-W3

### 2.6 AMP-W3 的抗菌生物学活性

**2.6.1 最低抑菌浓度** AMP-W3 浓度达到 2.5μg/ml 时表现出对溶藻弧菌的抗菌活性, 其抑菌圈直径随着浓度的升高而增大(图 3), 因此其最低抑菌浓度介于 1.25—2.5μg/ml。

**2.6.2 pH 值对抗菌肽 AMP-W3 抑菌活性的影响** 抗菌肽 AMP-W3 在不同 pH 处理下表现出不同的对溶藻弧菌的抗菌活性, 由图 4 可知, 在酸性条件(pH 5—7)下的抗菌活性高于碱性条件(pH = 7—9)。

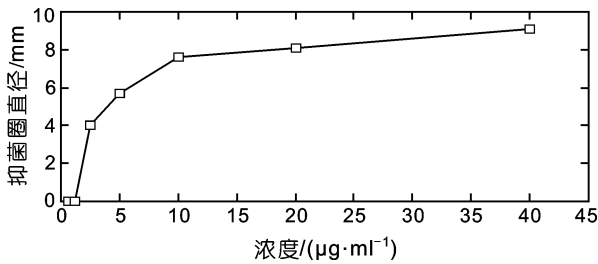


图3 不同浓度的 AMP-W3 对溶藻弧菌的抑菌效果

Fig.3 Antibacterial activities of AMP-W3 to *V. alginolyticus* at different concentrations

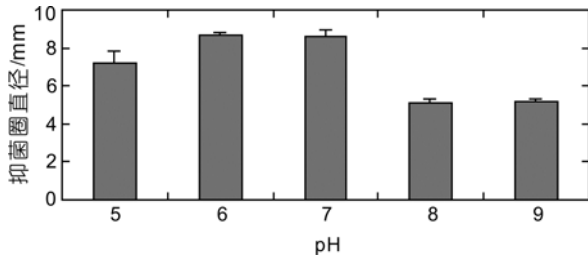


图4 不同 pH 处理后 AMP-W3 对溶藻弧菌的抑菌效果

Fig.4 Antibacterial activities of AMP-W3 to *V. alginolyticus* under different pH conditions

**2.6.3 抗菌谱测定** 从表1可以看出, 大黄鱼胃肠中提取的 AMP-W3 对 3 株革兰氏阴性菌、3 株革兰氏阳性菌和 2 株真菌都具有抗菌活性, 对 6 株细菌的抑菌圈直径大于对 2 株真菌的抑菌圈直径。

表1 AMP-W3 的抗菌图谱  
Tab.1 Antimicrobial spectrum of AMP-W3

菌株	革兰氏染色结果	抑菌圈直径 (mm)
奇异变形杆菌( <i>P. mirabilis</i> )	+	6.7±0.1
金黄色葡萄球菌( <i>S. aureus</i> )	+	5.4±0.1
枯草芽孢杆菌( <i>B. subtilis</i> )	+	6.3±0.1
副溶血弧菌( <i>V. parahaemolyticus</i> )	-	6.9±0.1
嗜水气单胞菌( <i>A. hydrophila</i> )	-	5.5±0.1
大肠杆菌( <i>E. coli</i> )	-	8.2±0.1
黑曲霉( <i>A. niger</i> )		4.2±0.2
产黄青霉( <i>P. chrysogenum</i> )		3.9±0.2

### 2.7 AMP-W3 的溶血性

AMP-W3 的浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  时就表现出对人红细胞的溶血性, 此时的溶血率为 1.90%。随着浓度的升高, AMP-W3 的溶血率也逐渐升高, 当浓度达到 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 其溶血率达到 100%(图 5)。

## 3 讨论

鱼类的胃肠道是与外界环境相通的内环境, 食物与水体中的微生物能够进入胃肠道, 其中有一部

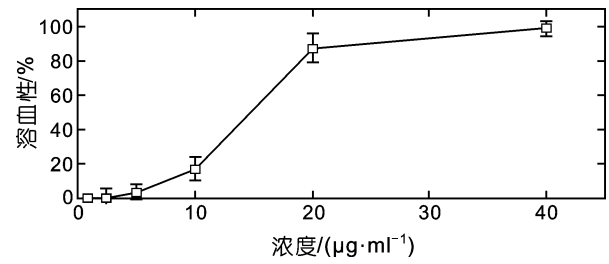


图5 AMP-W3 对人血红细胞的溶血性

Fig.5 Hemolytic activity of AMP-W3

分能在胃肠道中定植、繁殖。据研究, 鱼类肠道中的细菌数量可高达  $10^8$  CFU/g (覃映雪等, 2007), 远远高于水体中的细菌浓度。通常认为海水鱼肠道中的细菌以弧菌数量最多, 而弧菌中的许多种类都是鱼类的条件致病菌。已有研究表明, 鱼类的肠道是病原菌入侵的主要门户之一 (鄢庆彬等, 2006)。因此, 在鱼类的肠道组织中可能含有多种抗菌物质以抵抗病原微生物的入侵。目前已经从哺乳动物 (Agerberth *et al.*, 1991)、扁虱 (Nakajima *et al.*, 2005) 等动物的肠组织提取到多种抗菌肽, 并且, Cole 等 (1997) 从美洲黄盖鲷 (*Pseudopleuronectes americanus*) 胃肠 cDNA 文库中克隆得到了 317bp 的 Pleurocidin 基因序列, 但是尚未见从鱼体胃肠提纯抗菌肽的相关报道。本文研究发现大黄鱼肠道提取物的多个分离组分都表现出明显的抗菌活性, 说明在大黄鱼肠道组织中存在着多种抗菌物质。

10% 醋酸和 PB 常用于从动物组织中提取抗菌活性物质。本实验室预实验发现大黄鱼胃肠组织的 PB 提取液没有抗菌活性, 而 10% 醋酸提取液有较强的抗菌活性, 因此本研究采用 10% 醋酸提取大黄鱼胃肠组织中的抗菌物质。Lauth 等 (2002) 以 10% 醋酸粗提从石斑鱼体表黏液得到高纯度的抗菌肽 moronecin, Nakajima 等 (2005) 利用 10% 醋酸和 100 $^{\circ}\text{C}$  粗提, 最终从扁虱胃肠分离得到抗菌物质。本文利用 10% 醋酸粗提从大黄鱼胃肠中提取出抗菌活性物质, 说明这些抗菌物质易溶于有一定非极性的有机酸溶液中。目前已知多种抗菌肽具有很高的热稳定性 (Shinnar *et al.*, 1996), 因此加热处理可以消除热稳定性较差的抗菌活性物质的干扰。在本研究中, 加热可以使粗提液中一部分物质沉淀, 能够去除一部分杂质, 并且没有降低抗菌活性。

固相萃取 Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  小柱能够吸附样品中的疏水性蛋白, 然后利用极性高于吸附柱的不同浓度洗脱液分离样品中疏水性不同的成分。Mitta 等 (1999)

以  $C_{18}$  小柱作为前处理, 分离纯化出新型抗菌肽 Myticin。本实验中粗提物经 Sep-Pak  $C_{18}$  小柱分离得到的各收集管的蛋白浓度和抗菌活性各不相同, 而且抗菌活性与蛋白浓度之间没有对应关系, 说明各收集管的组分不同, 也说明粗提物得到了较好的分离。15% ACN 洗脱的组分抗菌活性较高, 蛋白浓度低, 说明其中含有的抗菌物质含量较大或抗菌物质的活性最强, 有利于下一步分离、纯化。15% ACN 洗脱液的蛋白质回收率低, 说明经过固相萃取后去除了绝大部分的杂质。固相萃取洗脱范围的确定也有利于下一步 RP-HPLC 的分离洗脱条件的摸索。

由于凝胶过滤层析时选用分级范围是 1000—5000Da 的 Sephadex G-25 作为填料, 具抗菌活性样品在 Sephadex G-25 纯化过程中出现三个峰(XL1, XL2, XL3), 根据分子量越小的蛋白越迟洗脱的原理, 可以说明第 26 管是分子量小于 5000Da 的多肽。在活性峰 XL3 处洗脱出来的物质, pI 值约为 4, 说明所分离的活性肽属于强阳离子肽。而有相关报道表明阳离子抗菌肽的电荷可直接影响其活性与选择性毒性(Van *et al*, 2003)。当阳离子抗菌肽的电荷小于+5 时, 抗菌性随正电荷数增加而增加; 当电荷大于+7 时, 增加正电荷对活性影响不大。同时, 在活性峰 XL3 处, 电导率降低(小于 1%), 说明 XL3 中的成分极性较小, 带电荷数少。

RP-HPLC 是现阶段纯化抗菌肽最后的通用途径, Fr.No.26 经过 RP-HPLC 分离, 其谱图的 UV215 峰远远多于凝胶过滤, 说明 RP-HPLC 的分离效果较好, 这是由于样品在  $C_{18}$  反相柱中, 固定相的极性小于流动相, 根据不同溶质分子的疏水性顺序洗脱, 疏水越强的物质在柱中保留时间越长, 分离效果较好。因此, Fr.No.26 经过 2 次 RP-HPLC 分离, 最后得到色谱纯的抗菌活性肽 AMP-W3。

虽然由于 N-端封闭暂时无法测定 AMP-W3 的氨基酸序列, 但从氨基酸组成来分析 AMP-W3 是富含天冬氨酸和谷氨酸的肽类, 该结论支持了过 Sephadex G-25 柱时等电点为 4.0 的结论, 并且甘氨酸的富集为 AMP-W3 提供了多个疏水性残基。与目前鱼体中分离的富含丝氨酸、精氨酸、亮氨酸等抗菌肽(Yoonkyung *et al*, 2008)不同, 是一类从鱼体胃肠组织中分离的新型多肽。假设 AMP-W3 含有一个异亮氨酸, 则可推断该肽含有 20 个氨基酸, 分子量约为 2400, 这与本文所得凝胶柱洗脱的最后一个峰的分子量较小相符。

抗菌肽对细菌和真菌都具有一个抑菌浓度的最

低临界值, 当抗菌肽的浓度低于这个值时不表现抗菌活性。AMP-W3 对溶藻弧菌的最低抑菌浓度为 1.25—2.5 $\mu\text{g/ml}$ , 低于 Moronecidin 对霍乱弧菌的最低抑菌浓度 2.5—5 $\mu\text{g/ml}$  (Lauth *et al*, 2002)和 Myticin 对溶藻弧菌 20 $\mu\text{g/ml}$  的 MIC 值(Mitta *et al*, 1999), 说明该抗菌肽较其它抗菌物质具有较高的抗菌活性。不同 pH 值处理的 AMP-W3 对溶藻弧菌具有不同的抗菌活性。Tincu 等(2003)的研究表明从瘤海鞘分离出的抗菌肽 Plicatamide 在 pH 5.5 的条件下对大肠杆菌的抑菌效果低于在 pH 7.4 的条件。然而, 实验表明 AMP-W3 在酸性环境中表达出较强的抗菌活性, 区别于 Plicatamide。

目前已知的大部分抗菌肽都具有广谱抗细菌和真菌的活性。Lauth 等(2002)从杂交斑纹鲈鱼体表和腮分离得到两种抗菌物质对金黄色葡萄球菌(+), 橙黄微球菌(+), 嗜水气单胞菌(-), 大肠杆菌(-), 鼠伤寒沙门氏菌(-), 烟曲霉等细菌和真菌生长具有一定抑制作用。本文得到的 AMP-W3 也对细菌和真菌表现出广谱抗菌活性, 符合抗菌肽的特征。

从溶血性测定结果可以得出, 该抗菌肽低于 1.25 $\mu\text{g/ml}$  时, 对人红细胞不表现溶血性, 与 Iijima 等(2003)测得真鲷抗菌肽 chrysophsin-3 对人体红细胞悬液的最低溶血值 1 $\mu\text{g/ml}$  的结果相近。

从本文的研究结果可以看出, 利用酸粗提、固相萃取、凝胶层析和 RP-HPLC 柱从大黄鱼的胃肠组织中分离、纯化出高纯度的抗菌肽 AMP-W3; AMP-W3 由天冬氨酸和谷氨酸等 10 种氨基酸组成, 明显区别于已知的鱼类抗菌肽, 分子量约为 2400Da; 该抗菌肽对革兰氏阳性菌, 革兰氏阴性菌以及真菌表现出广谱的抗菌活性; 在浓度高于 1.25 $\mu\text{g/ml}$  时, AMP-W3 能引起人血红细胞溶血, 其溶血率随浓度升高而增大。

## 参 考 文 献

- 邹文政, 纪荣兴, 鄢庆枇等, 2010. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*) 感染后牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)血清抗菌物质的研究. 海洋与湖沼, 41(4): 477—482
- 倪海儿, 王国良, 2009. 网箱养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 疾病与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 40(1): 72—77
- 覃映雪, 王晓林, 鄢庆枇等, 2007. 青石斑鱼肠道菌群研究. 海洋水产研究, 28(05): 10—23
- 鄢庆枇, 苏永全, 王 军等, 2001. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究. 集美大学学报(自然科学版), 6(3): 191—196
- 鄢庆枇, 陈 强, 邹文政等, 2006. 不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠黏液的影响. 水产学报, 30(02): 112—117
- Agerberth B, Lee J Y, Bergman T *et al*, 1991. Amino acid sequence of R-39: Isolation from pig intestine of a new mem-

- ber of family of praline-arginine-rich antibacterial peptides. *Euro Biochem*, 202: 849—854
- Cole A M, Weis P, Diamond G, 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem*, 272: 12008—12013
- Gerwick L, Corley G, Bayne C J, 2007. Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 157—171
- Hancock R E, Diamond G, 2000a. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends Microbiol*, 8(9): 402—410
- Hancock R E, Scott M G, 2000b. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(16): 8856—8861
- Hubert W A, Stonecypher R W, 1998. Relationships of the host, pathogen, and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(22): 107—111
- Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y *et al*, 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur J Biochem*, 70: 675—686
- Kajita Y, Sakai M, Atsuta S *et al*, 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol*, (25): 93—98
- Lauth X, Shike H, Burns J C *et al*, 2002. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J Biol Chem*, 277: 5030—5039
- Lee J H, Minn I L, Park C B *et al*, 1998. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 12: 53—60
- Lehrer R I, Rosenman M, Harwig S S L *et al*, 1991. Ultrasensitive assays for endogenous peptides. *Immunol Methods*, 137: 167—173
- Ma H M, Cahu C L, Zambonino J L *et al*, 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245: 239—248
- Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N *et al*, 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34(10): 3423—3429
- Mitta G, Hubert F, No 1 T *et al*, 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem*, 265: 71—78
- Nagashima Y, Kikuchi N, Shimakura K *et al*, 2003. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 136: 63—71
- Nakajima Y, Taylor D, Yamakawa M, 2005. Antibacterial peptides are secreted into the midgut lumen to provide antibacterial midgut defense in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Applied Entomology and Zoology*, 40(3): 391—397
- Oren Z, Shai Y, 1996. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin: a pore-forming peptide isolated from moses sole fish, *Pardachirus marmoratus*. *Euro J Biochem*, 237(1): 303—310
- Park C B, Lee J H, Park I Y *et al*, 1997. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Letters*, 411(23): 173—178
- Park I Y, Park C B, Kim M S *et al*, 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H<sub>2</sub>A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett*, 437(3): 258—262
- Park Y, Park H K, Lim H *et al*, 2008. Influence of N- and C-Terminal regions of Leu-Lys rich antimicrobial peptide on antimicrobial activity. *Protein and Peptide Letters*, 15(2): 188—192
- Shinnar A, Urell T, Rao M *et al*, 1996. Peptide Chemistry, Structure and Biology: Proceedings of the 14<sup>th</sup> American Peptide Symposium (Kaumaya P and Hodges R). Mayflower Scientific Ltd, Kingswinford, UK, 189—191
- Tincu J A, Menzel L P, Azimov R *et al*, 2003. Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela clava* hemocytes. *J Biol Chem*, 278(15): 13546—13553
- Van Kan E J M, Demel R A, Vander B A *et al*, 2003. The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavamin. *Biochem Biophys Acta*, 1615(12): 84—92
- Zaslo V M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389—395
- Zhang Junjie, Yan Qingpi, Ji Rongxing *et al*, 2009. Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 864—870

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE  
FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF LARGE YELLOW CROAKER  
*PSEUDOSCIAENA CROCEA***

JI Yong<sup>1</sup>, WANG Xiao-Lu<sup>1</sup>, SU Yong-Quan<sup>2</sup>, QIN Ying-Xue<sup>1</sup>, ZOU Wen-Zheng<sup>1</sup>,  
XING Yan-Li<sup>1</sup>, XU Xiao-Jin<sup>1</sup>, YAN Qing-Pi<sup>1</sup>

(1. Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Xiamen, 361021;  
2. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** The purpose of this study was to obtain antimicrobial peptide from the gastrointestinal tract of *Pseudosciaena crocea*. Our results showed that a novel antimicrobial peptide to *Vibrio alginolyticus* was isolated and purified using acid extraction, solid phase extraction, Sephadex G25 and reverse phase high performance liquid chromatography. The antimicrobial peptide, which was named AMP-W3, contained 10 different amino acids and was enriched in Glu, Gly and Asp. Minimal inhibition concentrations of the peptide were at 1.25—2.5 $\mu$ g/ml. Moreover, AMP-W3 were hemolytic for human red blood cells when its concentration was higher than 1.25 $\mu$ g/ml. In the acid condition, this peptide showed higher antimicrobial activity than in the alkaline solution, and displayed a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-negative, Gram-positive bacteria and fungi, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*, etc. This is the first time that an antimicrobial peptide was isolated from the gastrointestinal tract of fish, and it may help us to understand antimicrobial peptides and the innate anti-infective defense system of fish.

**Key words** Antimicrobial peptide, Purification, Biological activity, *Pseudosciaena crocea*