

·论 著·

重组柞蚕抗菌肽AD的纯化及鉴定

耿艺介¹, 张倩¹, 王兴顺¹, 李浩¹, 杨小柯¹, 李迎慧¹, 黄自然², 邓平建^{1*}

1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642

摘要: **目的** 从重组柞蚕抗菌肽AD毕赤酵母发酵液中分离纯化出抗菌肽纯品, 并对其进行纯度、分子量和抗菌作用的鉴定。 **方法** 用离子交换和疏水层析法对发酵液中的重组柞蚕抗菌肽AD进行分离纯化, 用高效液相色谱法分析产物的纯度, 再用基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪对产物进行分子量鉴定, 并结合传统微量肉汤稀释法和流式细胞术分析重组柞蚕抗菌肽AD纯品对 *E.coli* 敏感株及耐药株的抗菌作用。 **结果** 重组柞蚕抗菌肽AD经离子交换和疏水层析纯化后的纯度达到98.40%, 分子量为4068.15Da, 与所设计的重组柞蚕抗菌肽AD大小相近。所纯化出的重组柞蚕抗菌肽AD对 *E.coli* 的敏感株 ATCC25922 和产 β -内酰胺酶耐药株 ATCC35218 的抗菌作用均为 MIC 8 $\mu\text{g/mL}$, 而头孢他啶和氨苄西林对耐药株 ATCC35218 的 MIC 的值分别为 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 >32 $\mu\text{g/mL}$ 。 **结论** 成功纯化分离出具有自主知识产权的重组柞蚕抗菌肽AD, 其对 *E.coli* 敏感株和耐药株具有相同的抗菌效果。

关键词: 抗菌肽AD; 高效液相色谱; 基质辅助激光解析—飞行时间质谱; 流式细胞术

中图分类号: R 939.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2015)01-15-04

Purification and identification of recombinant Cecropin AD

GENG Yi-jie¹, ZHANG Qian, WANG Xing-shun, LI Hao, YANG Xiao-ke, LI Ying-hui, Huang Zi-ran, DENG Ping-jian

1. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong, P.R. China

Corresponding author: DENG Ping-jian, E-mail: 1124064573@qq.com

Abstract: **Objective** To separate and purify Cecropin AD from fermentation broth and to identify its purity, molecular weight and antibacterial action. **Methods** The ion exchange method and thin layer chromatography were adopted to purify cecropin AD from *Pichia pastoris* fermentation broth. The purity of purified products were analyzed by HPLC. Then the molecular weight of Cecropin AD was measured by MALDI-TOF/MS. The broth microdilution method and flow cytometry (FCM) were used to identify the antibacterial action of purified Cecropin AD. **Results** The purity of Cecropin AD that purified from *Pichia pastoris* fermentation broth reached 98.40%. The molecular weight was 4068.15Da and approached the designed size. MIC of Cecropin AD to ATCC25922 of *E.coli* strain sensitive to beta-lactamase and ATCC35218 of *E.coli* strain to beta-lactamase were both 8 $\mu\text{g/mL}$, while MIC of CAZ and AMP to ATCC35218 were 8 $\mu\text{g/mL}$ and more than 32 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Cecropin AD with the independent intellectual property rights was separated and purified successfully. It has the same antibacterial action sensitive quality control stand and resistant *E.coli* strain.

Key words: Cecropin AD; HPLC; MALDI-TOF/MS; FCM

国内外细菌耐药监测的相关研究数据表明, 细菌的抗生素耐药率及耐药谱正在以惊人的速度增长和扩展^[1-2], 感染性疾病的控制面临着前所未有的危机^[3]。抗菌肽作为一种抗菌谱几乎涵括所有重要临床致病菌的的抗菌活性肽, 有望成为新一代临床抗菌制剂的主要来源^[4]。为揭示重组柞蚕抗菌肽AD临床应用的可行性, 本研究取材用离子交换和疏水层析法对重组柞蚕抗菌肽AD毕赤酵母发酵液进行分离纯化, 用高效液相色谱技术对产物进行纯度鉴定。结合微量肉汤稀释法和流式细胞药敏方法测定重组柞蚕抗菌肽AD对 *E.coli* 敏感株和耐药株的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组柞蚕抗菌肽AD(Cecropin AD)由本

实验室纯化制备; 大肠杆菌 *E.coli* 的质控菌株 ATCC25922、ATCC35218 购自上海复祥生物科技有限公司。

1.1.2 试剂及仪器 LB 固体培养基、LB 液体培养基、MH 肉汤培养基、MH 琼脂糖培养基、头孢他啶(CAZ)、氨苄西林(AMP)及各种无机试剂均购自广州化学试剂厂; Cecropin B 抗菌肽标准品由美国 SIGMA 公司提供; 蛋白纯化系统为瑞典 AKTA EXPLORER; 高效液相色谱仪为美国 Agilent 1100; 基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪为德国 Microflex 产品; FACSARIA 流式细胞仪及彩虹微球由美国 BD 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 重组柞蚕抗菌肽AD的纯化 将柞蚕抗菌肽AD的毕赤酵母发酵液调至 pH4.0~4.5, 3 000rpm 离心

作者简介: 耿艺介(1970~), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 病原生物学。

*通讯作者: 邓平建, E-mail: 1124064573@qq.com

除蛋白;取上清液调pH6.0,用sephadex G50凝胶柱过滤,收集抗菌肽组分。用0.1M pH5.0~5.1的NH₄Ac/HAc缓冲液浸没CM-sepharase FF树脂达饱和后上柱抗菌肽发酵液600mL。用流速5mL/min层析120min后用0.1M pH5.0~5.1 NH₄Ac/HAc缓冲液冲洗去掉杂蛋白,再用0~1.0 M NaCl进行梯度洗脱。收集洗脱液,测定每管的抗菌肽活性。用Phenyl-sepharase 4L疏水性树脂层析进一步纯化所收集的抗菌肽混合液。在0.09Mpa、75℃以下真空浓缩到1/10体积。用超滤器加压超滤脱盐后(150±10)℃喷雾干燥,得到的黄褐色粉末,过筛100目,冷却后密封保存。

1.2.2 重组柞蚕抗菌肽AD的纯度测定 流动相A液为含0.01%三氟乙酸的水溶液(0.1%FA-98%水溶液),流动相B液为含0.01%三氟乙酸的乙腈溶液(0.1%FA-80%ACN溶液)。用不同浓度的抗菌肽标准品绘制抗菌肽浓度与峰高/峰面积相关的标准曲线,再在相同条件下测定所纯化重组柞蚕抗菌肽AD的峰高/峰面积,算出所纯化的毕赤酵母发酵液中重组柞蚕抗菌肽AD的浓度。在保证待测纯化重组柞蚕抗菌肽AD中所有组份均出峰的情况下,用标准样品Cecropin B抗菌肽的峰面积/峰高除以所有峰峰面积/峰高的总和即为所纯化的毕赤酵母发酵液中重组柞蚕抗菌肽AD的纯度。

1.2.3 重组柞蚕抗菌肽AD的分子量鉴定 将基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪的质量扫描范围调为500~5500Da。用已知分子量大小为3835.65Da的Cecropin B抗菌肽作为标准样品,将纯化的重组柞蚕抗菌肽AD与超纯水按1:1的比例稀释成不同浓度。每个稀释梯度以2μL上样,约20min待样品在基质分子中形成晶体后上基质辅助激光解析飞行时间质谱仪检测,测定重组柞蚕抗菌肽AD的分子量大小。

1.2.4 常规药敏试验 参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的方法,将重组柞蚕抗菌肽AD用MHB倍比稀释,设抗生素对照组、空白对照组和75%乙醇阴性对照组。每个96孔板孔内加入抗菌药物0.1 mL。用直接菌落悬液法将E.coli的敏感质控标准菌株ATCC25922和产β-内酰胺酶的质控标准菌株ATCC35218制成浊度为0.5麦氏的菌液,再用MHB按1:100稀释,取0.1 mL加入盘孔。接种好的微量稀释盘放在37℃普通空气孵箱中孵育16~20h。浊度测定以盘孔明显(约80%)生长受抑制的最低药物浓度为重组柞蚕抗菌肽AD对大肠杆菌E.coli的最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.5 流式细胞细菌药敏试验 用彩虹微球校准各通道激光的强度和变异系数,调节液流使其维持在稳

定的状态下,上流式细胞仪激发波长488 nm检测。用空白对照组(不进行标记的菌悬液)和阴性对照组(不经抗菌试剂处理的菌悬液)确定待测样品的基本荧光域值,用阳性对照组(经过30 min沸水煮沸的菌悬液)设定被PI染色的死亡目标细胞(门)。在直方图中,反映在各个不同荧光强度(X轴)时的不同细胞个数(Y轴),平行于X轴的直线门设定的是阳性区域,该图提供阳性区域内PI%。调节FSC电压值为650V,SSC电压值为200V,FL3电压值为850V,在FSC-SSC双参数图中设门圈定E.coli在流式细胞仪上的位置,在FSC-PI双参数图中设门将PI阳性和阴性区域划分开。每个样本收集10 000个细胞,每个实验数据做三次重复。用所确定的PI%含量作为测定CAZ、重组柞蚕抗菌肽AD对ATCC25922和ATCC35218测的MBC值的判定标准。用流式分析软件对数据进行统计作图。

2 结果

2.1 重组柞蚕抗菌肽AD的纯度 重组柞蚕抗菌肽AD纯化后,用HPLC测定其纯度为98.4%,见表1。

表1 HPLC测定的抗菌肽纯度
Table 1 Purity of Cecropin AD determined by HPLC

峰Peak	时间 Time	高度mm Height	面积mm ² Area	纯度 Purity%
1	12.963	10 349.930	67 428.359	1.4035
2	13.368	295 520.719	4 727 537.500	98.4031
3	20.263	1 298.718	9 292.701	0.1934

2.2 重组柞蚕抗菌肽AD的分子量 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪测得纯化重组柞蚕抗菌肽AD的分子量为4068.15Da,跟设计的重组柞蚕抗菌肽AD大小相近,见图1。

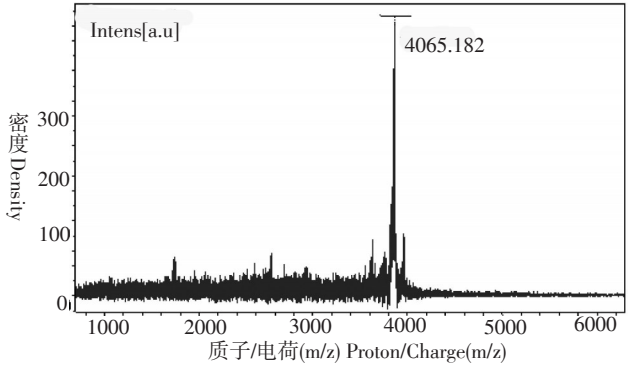


图1 基质辅助激光解析—飞行时间质谱测定的重组柞蚕抗菌肽AD分子量

Fig.1 Molecular weight of Cecropin AD measured by MALDI-TOF/MS

2.3 常规药敏结果 以CAZ、AMP为对照,根据NC-

CLS 药物敏感性的判断标准测定重组柞蚕抗菌肽 AD 对 *E.coli* 敏感株 ATCC25922 和耐药株 ATCC35218 的 MIC 值, 见表 2。

表 2 微量肉汤稀释法所测各菌的 MIC 值($\mu\text{g/mL}$)

Table 2 MIC determined by broth microdilution method

抗菌药物(Drug)	ATCC25922	ATCC35218
重组柞蚕抗菌肽(Cecropin AD)	8.0	8.0
头孢他啶(CAZ)	0.5	8.0
氨苄西林(AMP)	4.0	>32.0

2.4 流式药敏结果 通过预实验选取 0.5×10^5 CFU/mL 的最佳上机浓度和 3h 的最佳作用时间, 进行流式荧光强度的测定。未加任何药物处理的阴性对照大肠杆菌耐药株仅有 0.13% 被核荧光染料 PI 着色, 即存活细菌达到 99.87% (图 2)。用氨苄西林 (AMP) $32 \mu\text{g/mL}$ 处理细菌 3h 后, 细菌死亡率仅为 1.14% (图 3)。而用重组柞蚕抗菌肽 AD $1 \mu\text{g/mL}$ 处理 3h 后, 被染色的死亡细菌就达到了 19.3% (图 4)。并且随着重组柞蚕抗菌肽 AD 浓度增加, 细菌死亡比率也在不断增加, 当浓度达到 $64 \mu\text{g/mL}$ 时, 细菌死亡率不再明显增加 (图 5)

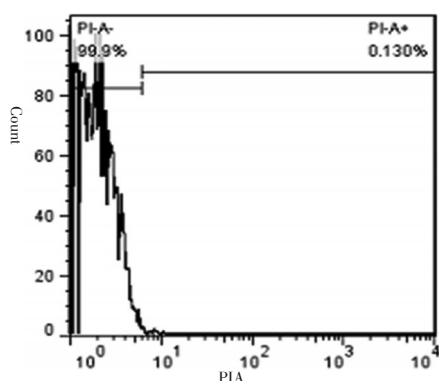


图 2 阴性对照的流式直方图

Fig. 2 Scatter histogram of negative control

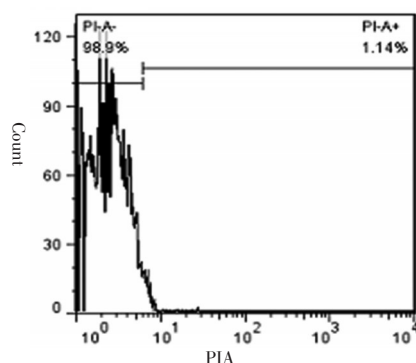


图 3 氨苄西林 $32 \mu\text{g/mL}$ 处理耐药菌 3h 直方图

Fig. 3 Scatter histogram of ATCC35218 treated with $32 \mu\text{g/mL}$ AMP for 3hrs

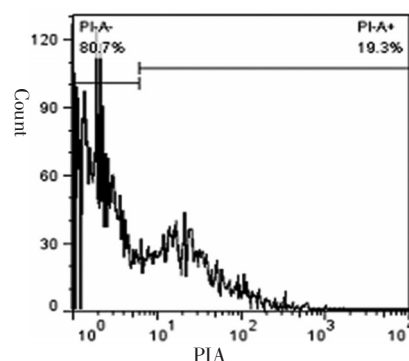


图 4 重组柞蚕抗菌肽 AD $1 \mu\text{g/mL}$ 处理耐药菌 3h 后直方图

Fig. 4 Scatter histogram of ATCC35218 treated with $1 \mu\text{g/mL}$ Cecropin AD for 3hrs

3 讨论

2010 年 8 月, 由多国科学家在 LANCET 上联合发表的论文, 揭示了耐绝大多数抗生素的“超级细菌”在世界各国的快速传播^[5], 引起了全世界的恐慌。抗生素的人为滥用是加剧细菌产生耐药性的重要推手, 对抗生素产生耐药性是细菌本身物种生存所要求的必然进化, 现有抗生素的合理利用和新型抗生素的不断研发只能延缓这一进程, 并不能最终遏阻耐药性的产生。2011 年, 发表在 Nature 上的研究表明细菌耐药性出现的自然性和不可避免性^[6]。所以, 促进抗菌肽这种与传统抗生素不同机制的新型抗菌制剂的开发和应用, 以辅助、补充或替代传统的抗生素, 对于解决和缓解感染性疾病耐药性具有重要的意义。但是, 尽管抗菌肽的发现和研究的至今已数十年, 而将其作为一种具有抗菌药物进行开发和利用的进展却一直迟滞不前^[7]。其原因主要有: 首先, 是活性抗菌肽的来源问题: 直接从生物细胞提取和纯化抗菌肽, 工艺复杂, 成本昂贵且资源有限; 通过化学合成制备抗菌肽, 成本过高, 且难以保持与天然抗菌肽结构及活性的等同性; 利用基因工程技术表达的重组抗菌肽又易被宿主细胞分解, 氨基酸组成不均衡, 表达效率较低, 常以融合蛋白形式表达, 难以获得纯品^[8]。其次, 对抗菌肽的临床应用价值缺乏合理的评估和定位: 抗菌肽作为生物经诱导产生的体液免疫成分, 虽然其作用比较微弱而泛化, 但却有着其独特的胞膜作用机制, 不依赖于被蛋白水解酶识别的抗原决定基, 因而更加主动而独立, 靶位变构以及产酶相关的细菌耐药机制都将无法得以实现^[9]。

本团队所构建的重组柞蚕抗菌肽 AD, 是根据天蚕抗菌肽 Cecropin A 的第 1~11 位氨基酸序列及 Cecropin D 第 12~37 位氨基酸序列设计重组的柞蚕抗菌肽 AD 基因。选育酵母偏爱的遗传密码设计合成的 141bp 的 AD 基因, 采用定点突变技术, 在 Lys 密码子 (AAG) 后面加入 Asp 密码子 (AAC), 成为 144bp 的基

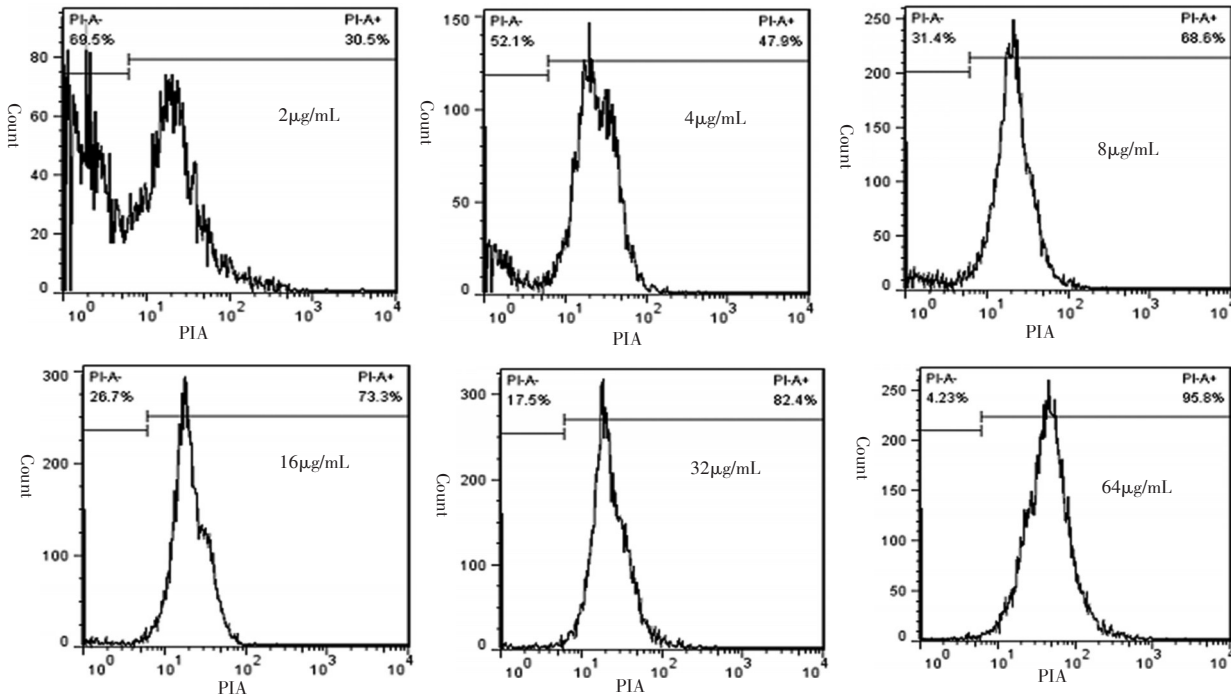


图5 不同浓度重组柞蚕抗菌肽AD处理耐药菌3h后的流式直方图

Fig. 5 Histogram of ATCC35218 treated with Cecropin AD for 3hrs

因,最终得到编码38个氨基酸残基的重组柞蚕抗菌肽AD。其大规模生产已经取得专利^[10]。含有重组柞蚕抗菌肽AD的发酵液作为饲料添加剂,已经部分取代了传统抗生素在饲料添加剂中应用,对大肠杆菌、金黄葡萄球菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌及白色念珠菌均有明显抗菌作用^[11]。本研究应用离子交换和疏水层析法对发酵液中的重组柞蚕抗菌肽AD进行高效而简便的分离纯化,所得到的重组柞蚕抗菌肽AD经高效液相色谱法分析,纯度达到98.40%,分子量也与所设计的大小相近。如将此工艺推广扩大到产业化生产,可解决抗菌肽来源问题。

微量肉汤稀释法是NCCLS推荐的标准方法,是抗生素药敏实验的金标准,但却无法直观地鉴定药物的对细菌是抑制生长还是彻底杀死。由于PI这种膜非渗透性荧光染料只能进入细胞膜完整性破坏的死亡细胞,与其DNA碱基对结合的特点,因此借助流式细胞术测定药物处理后细菌细胞被激发出的可测荧光强度,即可反映细菌被致死的百分率。本研究结合微量肉汤和流式细胞技术对所纯化的重组柞蚕抗菌肽AD进行药敏实验,测得重组柞蚕抗菌肽AD对*E. coli*敏感株ATCC25922和产β-内酰胺酶耐药株ATCC35218的MIC值为8µg/mL,而AMP对耐药株的MIC大于32µg/mL。虽然针对于敏感株,重组柞蚕抗菌肽AD的抗菌作用略弱于传统抗生素,但对于耐药株,却明显优于第二代青霉素,达到第三代头孢菌素

的体外抑菌水平。这一事实揭示了抗菌肽的潜在临床应用价值。

参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 5: 321-329.
- [2] McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Anti Chem*, 2013, 57(7):3348-3357.
- [3] Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A Clear and Present Danger? [J]. *Crit Care Res Pract*, 2012, 625170.
- [4] Pushpanathan M; Gunasekaran P; Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties [J]. *Int J Pept*, 2013, 675391.
- [5] Pinheiro da Silva F; Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications [J]. *Peptides*, 2012, 36(2):308-314.
- [6] D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient [J]. *Nature*, 2011, 477(7365):4574-61
- [7] Bechara FG, Sand M, Skrygan M, et al. Acne inversa: evaluating antimicrobial peptides and proteins [J]. *Ann Dermatol*, 2012, 24(4): 393-397.
- [8] Li Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(1): 1-9.
- [9] Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(13): 2161-2176.
- [10] 黄自然, 黄亚东, 温刘发, 等. 抗菌肽生物工程及其应用[J]. *蚕业科学*, 2005, 31(4): 375-381.
- [11] 邓平建, 房师松, 杨冬燕, 等. 转抗菌肽CAD基因酵母饲料添加剂的安全性评价[J]. *卫生研究*, 2004, 33(5): 565-568.

收稿日期: 2014-10-14 编辑: 符式刚