

## pH和色谱柱对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果的影响及抗菌活性检测

张东玲<sup>1 2 3 4</sup>, 关瑞章<sup>1 2 3 4\*</sup>, 黄文树<sup>1 4</sup>, 熊静<sup>1 4</sup>, 徐继松<sup>1 4</sup>, 宋宝东<sup>5</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

4. 集美大学鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

5. 鑫双宝生物科技(厦门)有限公司, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为了能够快捷地分离纯化出单一的抗菌肽, 实验采用不同 pH 值(离子交换流动相 pH 3.0、4.0、5.0; 反相液相层析流动相 pH 2.0、4.5、7.0) 缓冲液, 不同色谱柱(离子交换和凝胶过滤层析柱分别与反相液相层析柱) 联用对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果进行了比较, 并分析了琼脂板扩散法和微孔液体培养法检测抗菌活性的优缺点。结果显示: pH 4.0 缓冲液为最佳离子交换流动相, 蛋白提取率为 16.43%, 得到 2 个洗脱峰; 反相液相层析 3 种 pH 缓冲液分离效果均不理想, 凝胶过滤层析柱与反相液相层析柱联用能明显改善日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果, 洗脱峰数量较多, 峰形单一且尖锐狭窄, 基线平而低。琼脂板扩散法检测抗菌活性操作简单, 实验结果直观, 但所需蛋白量较多, 可用于蛋白粗提物抗菌活性的检测; 微孔液体培养法检测抗菌活性灵敏, 所需蛋白较少, 可用于后期色谱分离纯化蛋白抗菌活性的检测。

**关键词:** 日本鳗鲡; 抗菌肽; pH; 色谱柱; 抗菌活性

中图分类号: S 943

文献标志码: A

抗菌肽作为非特异性免疫的一个重要因子, 广泛分布于动植物、细菌和病毒内。它们具有广谱的抗菌抗病毒活性, 对包括抗革兰氏阳性菌、阴性菌、真菌、病毒、寄生虫甚至肿瘤也有很好的杀灭效果, 同时也有免疫调节、或直接作为免疫佐剂、灭活疫苗等<sup>[1-3]</sup>。近年来, 抗生素的大量使用导致耐药菌群的出现, 且耐药性越来越强, 人们希望能找到一种抗生素的替代品, 抗菌肽攻击细菌细胞膜的作用方式使人们相信细菌不易对其产生抗性, 它对耐药菌株良好的抑杀效果被证实后, 被认为是传统抗生素最佳替代品, 围绕它的理论与实践应用不断开展, 已有多种抗菌肽进入临

床试验或应用。

抗菌肽的获得主要有天然材料的提取和分子克隆两种方法。分子克隆技术比较成熟, 获得抗菌肽相对比较简单、快捷, 但所得抗菌肽均是已知的; 天然材料提取有利于发现新的抗菌生物活性物质, 不失为一种好的创新方法, 但其分离程序繁琐。天然材料提取抗菌肽仍是学术界一个研究热点。本实验探讨了采用不同分离纯化条件对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果的影响, 以及相应的抗菌活性检测技术, 以期今后抗菌肽的分离纯化提供重要的技术参考, 同时也丰富了抗菌肽研究的基础资料。

收稿日期: 2012-08-03

修回日期: 2012-12-28

资助项目: 公益性行业(农业) 科研专项( nyhyzx07-043); 福建省教育厅科技项目( JA09157); 厦门市工程技术研究中心创新项目( 3502Z20110014); 厦门市科技局重点项目( 3502Z20103023)

通信作者: 关瑞章, E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

冰冻的日本鳗鲡肝脏采集于福建东源烤鳗有限公司(中国福建莆田),  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。菌株迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*, B09)、气单胞菌(*Aeromonas* sp., B18)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*, B27)为农业部公益性行业(农业)科研专项菌种库提供, 编号均为本库编号。乙腈, 三氟乙酸(TFA)为色谱纯, 其它药品为分析纯。

### 1.2 肝脏蛋白样品的制备

肝脏抗菌活性物质的初提 称取肝脏 150 g, 用剪刀剪碎, 生理盐水清洗, 加入 900 mL 10% 冰醋酸, 匀浆 10 min(6 000 r/min)。匀浆液用磁力搅拌器  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  搅拌过夜, 次日  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 35 min, 收集上清液; 沉淀物加入 500 mL 10% 冰醋酸  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  搅拌 3 h, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 35 min, 收集上清液, 沉淀弃掉, 合并收集的上清液冻干备用。

肝脏抗菌活性物质的次提 初提冻干品加入 500 mL 10% 冰醋酸, 磁力搅拌器  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  搅拌 3 h, 再于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 35 min, 收集上清液。沉淀加入 300 mL 10% 冰醋酸, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 35 min, 收集上清液。合并收集的上清液, 沸水浴 10 min, 迅速置于冰水中冷却, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 35 min, 收集上清液冻干备用。

超滤次提的醋酸提取物 将次提冻干品溶于 500 mL Milli-Q 水中,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 10 min, 取上清液, 置于冰上, 并用 10 ku 超滤纤维柱切向流超滤, 整个系统压力保持 8~10 Psi, 收集分子量小于 10 ku 的样品, 冻干,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 不同 pH 缓冲液对离子交换层析分离纯化蛋白效果的影响

Milli-Q 水溶解小于 10 ku 冻干样品,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 10 min, 上清液用预装柱(HiTrap™ CM FF 5 mL)离子交换层析分离。纯化系统: ÄKTA Purifier 100。流动相: 缓冲液 A [0.1 mol/L 乙酸钠(pH 3.0、4.0、5.0)]; 缓冲液 B [4 mol/L 乙酸铵]。色谱条件: 未结合的样品用 20 mL A 液洗脱; 结合的样品用 100 mL 4 mol/L 乙酸铵 0~100% 线性洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长: 280 nm。比较 3 种 pH 值对蛋白提取得率的影响, 蛋白提取得率 = 洗脱峰面积/总峰面积, 及峰形和峰

保留体积。

### 1.4 不同 pH 缓冲液对反相液相色谱分离纯化蛋白效果的影响

将离子交换层析分离洗脱峰样品, 用 Source 5R RPC-ST-4.6/150 预装柱反相液相层析分离。预装柱先用 5 mL A 液洗脱, A 液包括: A1(pH 2.0 0.1% TFA 2% 乙腈 ACN)、A2(pH 4.5 0.01 mol/L 乙酸钠 2% ACN)、A3(pH 7.0 0.01 mol/L 磷酸钾 2% ACN), 再用 45 mL B 液(70% ACN) 0~100% 梯度洗脱。纯化系统: ÄKTA Purifier 100, 流速: 1 mL/min, 检测波长:  $A_{280\text{ nm}}$ 。比较 3 种 pH 值洗脱峰色谱图分离效果。

### 1.5 凝胶过滤和反相液相层析柱联合对分离纯化蛋白效果的影响

Milli-Q 水溶解小于 10 ku 冻干样品,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\ 000\times\text{g}$  离心 10 min, 上清液用凝胶过滤层析柱 Sephadex G-25 凝胶过滤层析分离。纯化系统: ÄKTA Purifier 100。样品上样后用 300 mL 乙酸铵缓冲液(10 mmol/L, pH 6.6)洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长:  $A_{280\text{ nm}}$ 。

将凝胶过滤层析洗脱峰样品, 用 Source 5R RPC-ST-4.6/150 预装柱反相液相层析分离。预装柱先用 5 mL A 液(pH 2.0 0.1% TFA, 2% ACN)洗脱, 再用 45 mL B 液(70% ACN) 0~100% 梯度洗脱。纯化系统: ÄKTA Purifier 100, 流速: 1 mL/min, 检测波长:  $A_{280\text{ nm}}$ 。观察洗脱峰色谱图分离效果。

### 1.6 两种方法检测抗菌活性的比较

琼脂板扩散法检测抗菌活性 蛋白浓度测定参照 Bradford 方法, 牛血清白蛋白做标准对照<sup>[4]</sup>。取对数生长期的细菌用生理盐水调至浓度为  $1\times 10^8$  cfu/mL, 再制作成 20 mL 含细菌浓度为  $1\times 10^5$  cfu/mL 的混菌平板。待平板冷却后, 每个平板打 4 个孔径为 3 mm 的孔, 前 3 个孔内分别加入 16  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品, 第 4 个孔内加入 16  $\mu\text{L}$  Milli-Q 水,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 观察并测定抑菌圈大小, 抑菌半径指示抗菌活性大小。将蛋白样品稀释, 终浓度为 250、125、62.5、31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 同种方法检测抗菌活性。

微孔液体培养法检测抗菌活性 参考 Anderson 等<sup>[5]</sup>的方法略加改动。将对数生长期的细菌悬液用生理盐水调至浓度为  $1\times 10^5$  cfu/mL, 同时将小于 10 ku 的样品稀释为浓度 500、250、

<http://www.scxuebao.cn>

125、62.5、31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  备用。抗菌活性的检测采用96孔板检测,实验组中加入16  $\mu\text{L}$ 待检测样品和等体积的细菌悬液,样品空白组中加入16  $\mu\text{L}$ 待检测样品和等体积的0.85%生理盐水;细菌组中加入16  $\mu\text{L}$ 细菌悬液和等体积的0.85%生理盐水,细菌空白组加入32  $\mu\text{L}$ 0.85%生理盐水。而后将96孔培养板置于28  $^{\circ}\text{C}$ 培养3 h后每孔中加入50  $\mu\text{L}$ 无菌的MHB培养基,28  $^{\circ}\text{C}$ 培养21 h,在酶标仪上检测 $\text{OD}_{620}$ 的值。实验重复2次,按下列公式计算杀菌指数( $K_i\%$ )。

杀菌指数  $K_i\% = [1 - (\text{实验组 } \text{OD}_{620} - \text{样品空白 } \text{OD}_{620}) / (\text{细菌 } \text{OD}_{620} - \text{细菌空白 } \text{OD}_{620})] \times 100\%$

## 2 结果

### 2.1 不同 pH 缓冲液对离子交换层析分离纯化蛋白效果的影响

在同样洗脱的条件下,3种pH(3.0、4.0、5.0)缓冲液的蛋白提取率分别为11.82%、16.43%、6.59%,其中pH 4.0缓冲液的蛋白提取率最高(图1)。pH 3.0和pH 4.0缓冲液分离纯化蛋白得到2个洗脱峰,pH 5.0缓冲液只得到一个洗脱峰,说明pH 3.0和pH 4.0缓冲液分离纯化蛋白更灵敏。综合考虑pH 4.0缓冲液分离纯化蛋白效果最好,定为离子交换层析的流动相。

### 2.2 不同 pH 缓冲液对反相液相色谱分离效果的影响

离子交换层析洗脱峰样品(图1-b)用反相液相层析预装柱Source 5R RPC-ST-4.6/150经3种不同的pH缓冲液分离。3种pH缓冲液洗脱效果均不理想,洗脱峰基线很高,并没有单一的峰出现,说明日本鳗鲡肝脏可能含有大量疏水性相近的物质,如果要分离到单一的物质,必须要采用其他分离方法。缓冲液A1(图2-a)洗脱峰出峰时间为12.60~23.02 min,洗脱乙腈浓度为11.82%~28.03%;缓冲液A2(图2-b)洗脱峰出峰时间为13.19~33.95 min,洗脱乙腈浓度为12.74%~45.03%;缓冲液A3(图2-c)洗脱峰出峰时间为35.15~46.03 min,洗脱乙腈浓度为46.90%~63.82%。其中缓冲液A1洗脱峰出现时间最早,洗脱乙腈浓度最低。TFA是目前应用最为广泛的离子对试剂,其优点包括可挥发性,易通过冷冻干燥除去,在肽和蛋白质的检测波长范围内具有低

吸收性,长期的实验证实了其具有良好的稳定性<sup>[6]</sup>,因此如果后续实验采用其他分离方法,此实验可选择缓冲液A1洗脱。笔者应用此流动相结合反相高效液相色谱成功分离到一抗菌肽AJHb $\alpha$ <sup>[7]</sup>。

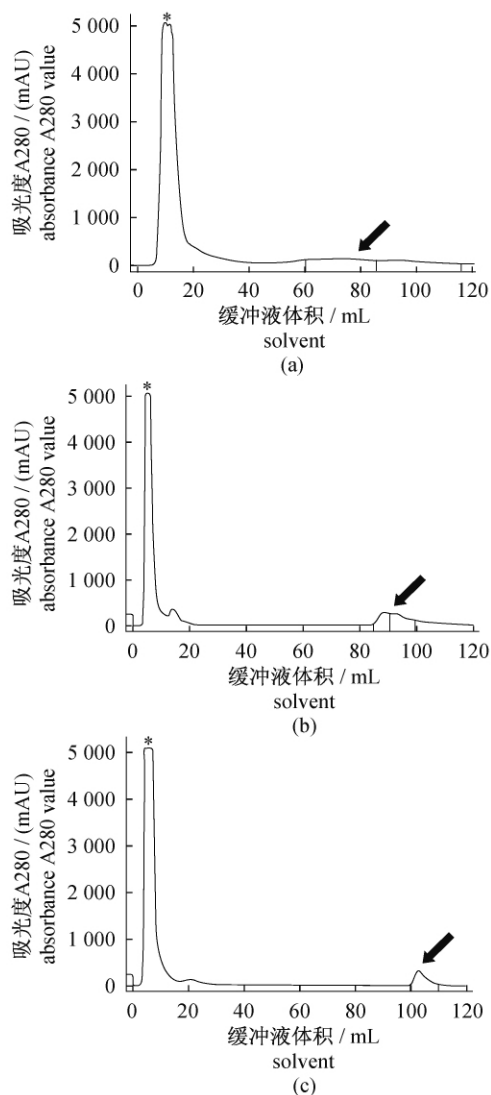


图1 不同pH值缓冲液用于离子交换层析分离分子量小于10 ku蛋白样品的效果

(a) pH 3.0 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液; (b) pH 4.0 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液; (c) pH 5.0 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液。星号表示流穿峰,箭头表示洗脱峰。

Fig. 1 Effect of different pH solvent in cation exchange chromatography for isolation of the protein sample of MW < 10 ku

(a) solvent of 0.1 mol/L sodium acetate, pH 3.0; (b) solvent of 0.1 mol/L sodium acetate, pH 4.0; (c) solvent of 0.1 mol/L sodium acetate, pH 5.0. The asterisk indicates flow peak, the arrow indicates elution peak.

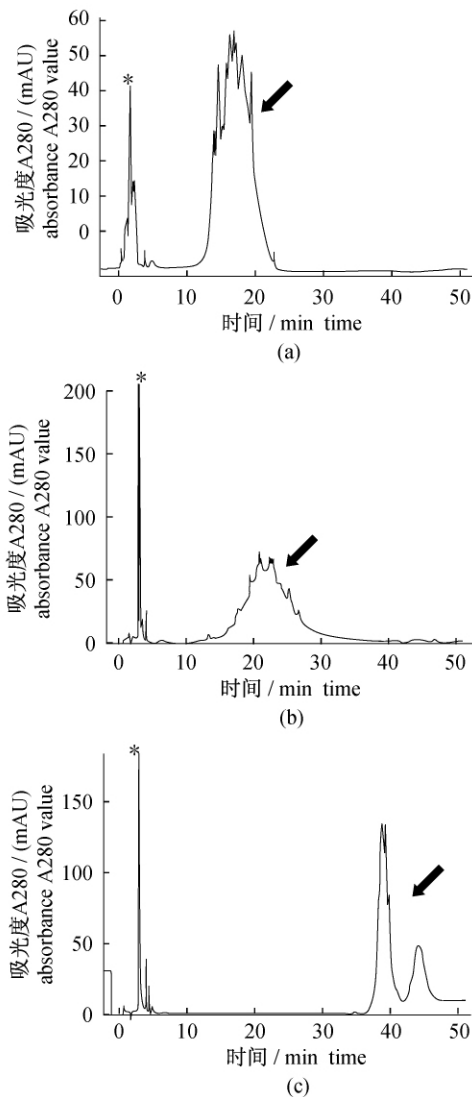


图2 不同 pH 值缓冲液用于反相液相层析分离离子交换洗脱峰的效果

(a) 缓冲液 A1 (pH 2.0 0.1% TFA 2% 乙腈); (b) 缓冲液 A2 (pH 4.5 0.01 mol/L 乙酸钠 2% 乙腈); (c) 缓冲液 A3 (pH 7.0 0.01 mol/L 磷酸钾 2% 乙腈)。

Fig. 2 Effect of buffer solution with different pH in reversed phase chromatography for isolation of the fractions obtained from cation-exchange chromatography

(a) solvent A1 (2% ACN/0.1% TFA, pH 2.0); (b) solvent A2 (2% ACN/0.01 mol/L sodium acetate, pH 4.5); (c) solvent A3 (2% (ACN) /0.01 mol/L potassium phosphate, pH 7.0) .

### 2.3 凝胶过滤和反相液相层析柱联合对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果的影响

小于 10 ku 样品用凝胶柱 Sephadex G-25 和反相液相色谱层析柱分离(图 3-a, 图 3-b), 收集凝胶柱液相层析洗脱峰(图 3-a) 经反相液相层析

洗脱, 几乎没有流穿峰(图 3-b), 可以判定经凝胶柱洗脱的样品与反相液相色谱柱结合非常好, 洗脱峰较多, 大多数峰形单一且尖锐狭窄, 基线平而低, 尽管峰形左右不对称, 但其上升和下降的趋势都呈现明显的直线形状。因此, 对于日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化, 凝胶柱与反相液相层析柱联用要比离子交换与反相液相层析柱联用分离效果好(图 1, 图 2)。

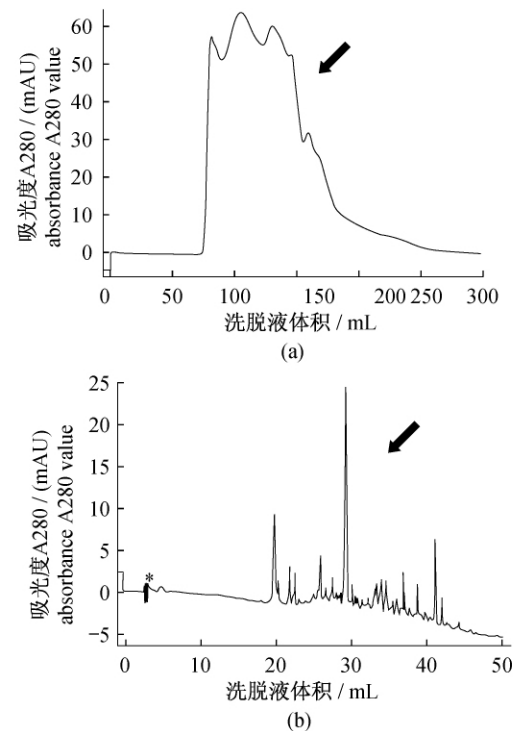


图3 凝胶过滤层析柱和反相液相层析柱联用对日本鳗鲡肝脏小于 10 ku 蛋白样品分离纯化的效果

(a) 凝胶过滤层析分离小于 10 ku 蛋白样品; (b) 反相液相层析分离凝胶过滤层析洗脱峰样品的效果。

Fig. 3 Effect of Sephadex G-25 gel permeation chromatography and reverse-phase liquid chromatography for isolation of the protein sample of MW < 10 ku

(a) Elution profile for Sephadex G-25 gel permeation chromatography of the protein sample of MW < 10 ku; (b) Elution profile for reversed phase chromatography of the fractions obtained from Sephadex G-25 gel permeation chromatography.

### 2.4 琼脂板扩散法检测抗菌活性

采用琼脂板扩散法检测分子量小于 10 ku 不同蛋白量样品对  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株的抗菌活性, 除 8  $\mu$ g 蛋白样品有抗菌活性外, 其余蛋白量样品均未被检测出抗菌活性(表 1)。

<http://www.scxuebao.cn>

表1 琼脂板扩散法检测分子量小于10 ku 不同量蛋白样品对  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株的抗菌活性  
 Tab.1 Antibacterial activity of different quantity protein sample of MW <10 ku against  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09 ,B18 and B27 with agar plate diffusion method( radius of inhibition zone mm)

菌株 bacterial strains	不同蛋白量样品抑菌半径/mm different quantity protein sample bacteriostatic radius				
	8.0 $\mu$ g	4.0 $\mu$ g	2.0 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g
B09	11.00 $\pm$ 0.85	0	0	0	0
B18	13.20 $\pm$ 1.27	0	0	0	0
B27	15.50 $\pm$ 3.11	0	0	0	0

## 2.5 微孔液体培养法检测抗菌活性

采用微孔液体培养法检测分子量小于10 ku 不同量蛋白样品抗菌活性,不同蛋白量样品对  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株的抗菌活性如表2所示,5种不同蛋白量样品对  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株均能检测出抗菌活性。

表2 微孔液体培养法检测分子量小于10 ku 不同量蛋白样品对  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株的抗菌活性  
 Tab.2 Antibacterial activity of different quantity protein sample of MW <10 ku against  $1 \times 10^5$  cfu/mL B09 ,B18 and B27 with microtiter liquid culture method

菌株 bacterial strains	不同蛋白量样品杀菌/抑菌指数 $K_i$ % different mass protein sample bactericidal/bacteriostasis index				
	8.0 $\mu$ g	4.0 $\mu$ g	2.0 $\mu$ g	1.0 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g
B09	100%	100%	79.75% $\pm$ 1.83%	65.27% $\pm$ 2.00%	28.05% $\pm$ 2.33%
B18	100%	100%	85.04% $\pm$ 3.13%	73.35% $\pm$ 4.39%	30.79% $\pm$ 3.19%
B27	100%	100%	96.38% $\pm$ 3.49%	87.47% $\pm$ 2.71%	45.07% $\pm$ 2.35%

## 3 讨论

### 3.1 不同 pH 缓冲液对离子交换层析提取率的影响

蛋白质分子所带电荷的种类和数量并非非常数,而是与溶液的 pH 值直接相关。当 pH 小于等电点 pI 时蛋白质带净的正电荷,而当 pH > pI 时蛋白质带净的负电荷。合理选择溶液的 pH 能保证目的分子带上一定电荷而发生吸附,同时杂质分子尽可能少地被吸附。鱼类抗菌物质多为阳离子蛋白/肽,纯化过程中常采用阳离子交换柱。Noga 等<sup>[8]</sup>应用阳离子交换柱,以 pH 5.5 缓冲液为流动相,从杂交的条纹鲈(white bass, *Morone chrysops*, female,  $\times$  striped bass, *Morone saxatilis*, male) 纯化得到 Piscidin 4。Wang 等<sup>[9]</sup>应用阳离子交换柱,以 pH 5.0 缓冲液为流动相,从篮子鱼(*Siganus oramin*) 血浆纯化得到一个对刺隐核虫(*Cryptocaryon irritans*) 有致死作用的蛋白。本实验以 pH 4.0 缓冲液作为流动相,样品与阳离子柱结合的蛋白最多,有2个洗脱峰,同时我们也能推断出该样品中有多数蛋白等电点大于4.0。

### 3.2 不同 pH 缓冲液对反相液相色谱分离效果的影响

反相色谱(reversed phase chromatography, RPC)是基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的一种色谱模式。强大的分离效率使其成为蛋白质和多肽纯化的非常有利工具。反相色谱分离通常在低 pH 条件下进行,一般在 pH 2~4,使用较低 pH 可以增加样品的溶解性,抑制酸性侧链和硅基支持物上剩余硅羟基的离子化。但中性磷酸盐也不失为一种好的方法,且在此条件下蛋白可保持生物活性。pH 值的较大变化往往会对分析结果产生很大影响,因此流动相 pH 值的调节也是分析过程中至关重要的一个环节。宋永康等<sup>[10]</sup>分析了流动相 pH 值对9种有机酸分离效果的影响,结果发现不同 pH 值对分析结果影响很大,不仅会大大改变各有机酸的保留值,甚至会导致无法将各有机酸分离。梁英<sup>[11]</sup>比较了几种不同 pH 值缓冲液在反相柱上对日本鳗鲡脾脏样品分离纯化效果的影响,结果发现 pH 9.0 缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl 2% 乙腈)获得较好的分离效果,表现为峰更多,更尖锐,保留时间更长。Jiravanichpaisal 等<sup>[12]</sup>采用0.05%的

<http://www.scxuebao.cn>

TFA 从小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 的血淋巴中分离得到一个富含脯氨酸和精氨酸的抗菌肽 astacidin 2。本实验我们只摸索了 pH 2.0、4.5、7.0 的缓冲液, 当 pH 达到 7.0 时, 峰数量极少, 乙腈浓度接近 100%, 说明随着 pH 值的增大, 肝脏同反相柱结合力越强, 且结合的多为疏水性相似的物质, 因此没必要继续摸索 pH 大于 7.0 的缓冲液。

### 3.3 不同色谱柱对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果的影响

对于蛋白或多肽的分离纯化一般选择分离原理差异比较大的色谱柱联用分离, 因为这样可以将某一方面性质相似的蛋白或多肽有效分离。实验开始选择阳离子交换柱, 收集到阳离子蛋白, 再用反相液相层析, 收集到疏水性蛋白, 同时也起到脱盐的作用。但是反相液相层析分离效果并不好, 因此我们探索凝胶过滤层析和液相反相层析联用分离纯化日本鳗鲡肝脏抗菌肽的效果。这两种柱子分离原理也不同, 凝胶 Sephadex G-25 分离得到 1~5 ku 分子量蛋白, 实验证明此方法分离效果远比离子交换和反相液相层析联用分离效果好, 日本鳗肝脏 1~5 ku 分子量蛋白与反相液相层析柱结合非常好, 几乎没有流穿峰(图 3), 事实上很多抗菌肽也是通过此方法分离得到的<sup>[13-15]</sup>。反相柱也有采用不同规格的, 如 C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>4</sub> 等。

### 3.4 两种抗菌活性检测方法的选择

在抗菌肽的分离纯化过程中, 如何保证抗菌活性是至关重要的。因此, 在抗菌肽分离纯化的每一步均需要检测抗菌活性, 否则就失去了分离纯化的意义。初始的抗菌物质初提, 蛋白量非常多, 即有非常多的蛋白可用于抗菌活性检测, 而随着后续的色谱分离纯化, 所得蛋白量越来越少, 尤其是最后单一肽时, 蛋白量达到微克级, 检测抗菌活性的蛋白量也随之减少。因此, 选择有效的抗菌活性检测方法, 也是抗菌肽分离纯化的重要技术。本实验比较了琼脂板扩散法和微孔液体培养法检测抗菌活性技术, 发现微孔液体培养法远比琼脂板扩散法检测灵敏, 节约样品。微孔液体培养法检测小于 10 ku 样品, 蛋白量达到 0.625 μg 时仍然能对 1 × 10<sup>6</sup> cfu/mL B09、B18 和 B27 菌株表现出抗菌活性, 而琼脂板扩散法蛋白量达到 4 μg 时即对三种菌株表现不出抗菌活性。当然琼脂板扩散法也有优点, 如操作简单, 实验结果直

观, 实验比较经济实用。因此在实验初期, 蛋白粗提时应用琼脂板扩散法检测抗菌活性, 而后期蛋白量较少, 选择应用微孔液体培养法检测抗菌活性。

目前对于抗菌活性检测技术的研究也有一些的报道。Birkemo 等<sup>[16]</sup>用微孔液体培养法和琼脂板扩散法检测了合成抗菌肽 hipposin 和 pleurocidin 的抗菌活性, 发现微孔液体培养法更加灵敏。而且两种方法检测结果不完全一致, 微孔液体培养法检测出 Hipposin 对李斯特氏菌 (*L. ivanovii*) 要比对其它细菌灵敏。而琼脂板扩散法检测出 Hipposin 则是对鸟肠球菌 (*E. avicum*)、荧光假单胞菌 (*P. fluorescences*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 更加灵敏。这表明不同抗菌活性检测方法可能会影响抗菌肽对细菌的抑菌或杀菌能力。邬晓勇等<sup>[17]</sup>也报道抗菌肽的分子结构较抗生素来说比较复杂, 并且实现其生物活性还需其特定的空间结构, 而琼脂板由于其网状结构的特点可能会影响抗菌肽的空间结构, 而不能真正发挥出抗菌肽的抑菌作用。抗菌肽抗菌活性检测方法还有很多, 如杯碟法、贴纸片法、涂板法、微量液体培养法等等, 实际应用时要根据实际情况选择具体工具。

### 参考文献:

- [1] Bell A. Antimalarial peptides: the long and the short of it [J]. *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17(25): 2719-2731.
- [2] Hancock R E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. *The Lancet Infectious Diseases* 2001, 1(3): 156-164.
- [3] Rajanbabu V, Chen J Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future [J]. *Peptides* 2011, 32(2): 415-420.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(7): 248-254.
- [5] Anderson R S, Beaven A E. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma [J]. *Aquatic Living Resources* 2001, 14(6): 343-349.
- [6] Carr D. The handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC [M]. 3rd. Hesperia: Grace Vydac Advances 2002.

<http://www.scxuebao.cn>

- [7] Zhang D L, Guan R Z, Huang W S *et al.* Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.022.
- [8] Noga E J, Silphaduang U, Park N G *et al.* Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 152(4): 299–305.
- [9] Wang F H, Xie M Q, Li A X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 32–41.
- [10] 宋永康, 郭嘉, 潘葳. 影响测定反相高效液相色谱流动相 pH 值的因素 [J]. 现代科学仪器, 2005, 1: 95–97.
- [11] 梁英. 日本鳗鲡表皮粘液和脾脏抗菌肽的分离纯化 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2011.
- [12] Jiravanichpaisal P, Lee S Y, Kim Y A, *et al.* Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2007, 31(5): 441–455.
- [13] Lu Y, Li J X, Yu H N, *et al.* Two families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis* [J]. Peptides, 2006, 27(12): 3085–3091.
- [14] Zhang J J, Yan Q P, Ji R X, *et al.* Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2009, 26(6): 864–870.
- [15] Lu J, Chen Z W. Isolation, characterization and anti-cancer activity of SK84, a novel glycine-rich antimicrobial peptide from *Drosophila virilis* [J]. Peptides, 2010, 31(1): 44–50.
- [16] Birkemo G A, Lüders T, Andersen Ø *et al.* Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2003, 1646(1–2): 207–215.
- [17] 邬晓勇, 何钢, 颜军, 等. 抗菌肽抑菌活性测定方法的研究 [J]. 生物学通报, 2011, 46(4): 44–47.

## Effects of pH and chromatographic column on isolation , purification of antibacterial peptide from Japanese eel liver , and determination of antibacterial activity

ZHANG Dongling<sup>1 2 3 #</sup> , GUAN Ruizhang<sup>1 2 3 #\*</sup> , HUANG Wenshu<sup>1 #</sup> ,  
XIONG Jing<sup>1 #</sup> , XU Jisong<sup>1 #</sup> , SONG Baodong<sup>5</sup>

(1. College of Fisheries , Jimei University , Xiamen 361021 , China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology , Institute of Hydrobiology ,  
Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430072 , China;

3. Graduate School , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China;

4. Engineering Research Center of Eel Modern Industry Technology , Ministry of Education , Xiamen 361021 , China;

5. Subio-Tech( Xiamen) LTD , Xiamen 361021 , China)

**Abstract:** In order to quickly isolate and purify antimicrobial peptide , different flow phase pH values( cation-change pH 3.0 , 4.0 , 5.0 , and reverse-phase liquid chromatography pH 2.0 , 4.5 , 7.0) , and different chromatographic columns ( cation-change and gel chromatography coupled with reverse-phase liquid chromatography respectively) were used to isolate and purify antibacterial peptide from *Anguilla japonica* liver and the results were analysed and compared. The merits and drawbacks of agar plate diffusion and microporous liquid culture methods on determination of antibacterial activity were analysed. The results showed that pH 4.0 buffer solution was the best flow phase in three-pH-value buffer solutions , which had 16.43% extraction ratio and isolated two elution peaks; We did not obtain perfect result from reverse-phase liquid chromatography ( RPC) in three-pH-value buffer solutions; Sephadex G-25 gel coupled with RPC significantly improved the isolation effect , elution peak amounts were greater , peaks were sharper and narrower , baseline was flatter and low than those of cation exchange coupled with RPC. Agar plate diffuse method to determine antibacterial activity was simple to operate , and experimental result was intuitional. It required much protein , so it should be used to determine antibacterial activity during protein crude extraction period; Microporous liquid culture method to determine antibacterial activity was sensitive. It required little protein , so it should be used to determine antibacterial activity during isolation and purification of protein in chromatography period.

**Key words:** Japanese eel; antibacterial peptide; pH; chromatographic column; antibacterial activity

**Corresponding author:** GUAN Ruizhang. E-mail: rzguan@jmu.edu.cn