

弱酸性家蝇蛆抗菌肽 MD₇₀₉₅ 的分离纯化及性质研究

陆 婕¹ 汪俊汉² 钟 雅¹ 赵燕英¹ 陈正望^{1*}

(华中科技大学¹ 生命科学与技术学院生物物理与生物化学研究所² 附属医院 武汉 430074)

摘 要 家蝇抗菌肽多是碱性蛋白,目前尚无弱酸性家蝇抗菌肽的报道。通过稀醋酸低温浸提,海藻酸吸附,稀盐酸低温洗脱、盐析、Sephadex G25 凝胶过滤和 CMC23 弱阳离子交换柱层析等方法,利用灵敏的杀菌活性检测手段,从家蝇蛆(*Musca domestica* larvae)中分离纯化出一组弱酸性抗菌肽,对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)等革兰氏阳性菌和几种革兰氏阴性菌有强烈的杀灭作用,有极强的耐热、耐冻融的特性。通过电洗脱方法进一步纯化出抗菌肽 MD₇₀₉₅,质谱测定其分子量 7095Da,IEF 电泳测得其等电点 5.59,经肽质量指纹谱(PMF)鉴定为一新肽。扫描电镜超微结构观察表明,弱酸性家蝇蛆抗菌肽对苏云金芽孢杆菌的杀菌机制主要是使细胞膜穿孔,内容物外泄,最终使细菌完全解体死亡。

关键词:家蝇蛆,抗菌肽,抗菌活性,细胞膜穿孔

中图分类号:Q514.3 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)03-0406-06

抗生素在现代医学发展史上起到了很重要的作用,但随着抗生素的广泛和长期使用,以及日益严重的抗生素滥用现实,造成细菌发生突变,产生耐药性。传统的抗生素是通过抑制细菌的蛋白质或 DNA 的合成以及破坏细胞壁来发挥作用,其过程需要特殊受体,微生物很容易通过基因突变对药物产生抗性。抗菌肽作用机理不同于传统抗生素,一般是通过物理作用造成细胞膜的穿孔,不需要特殊的受体,不会导致抗药菌株的产生,因此极有希望开发成为一类新型多肽抗生素。寻找新的抗菌肽已成为生命科学领域中的热门研究课题。

昆虫抗菌肽是昆虫体液免疫的重要成分,具有分子量小、对热稳定、广谱抗菌等特点。Boman 等^[1]首先从惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)的滞育蛹中分离出第一个昆虫抗菌肽 Cecropin,之后人们陆续从家蚕、柞蚕、蚊虫等昆虫体内分离出 700 多种抗菌肽。家蝇蛆生活在杂菌横生的环境中,周身携带很多病菌而自身却无感染,这种适应恶劣环境的能力预示着它们在免疫防御方面有着独特机制。从家蝇蛆中分离抗菌活性物质,对抗菌药物的开发是一种新的有效途径。80 年代国外学者已从棕尾别麻蝇(*Sarcophaga peregrina*)和绿蝇(*Phormia terranova*)体内分离到了麻蝇素 Sarcotoxin I、II、III 和绿蝇双翅

肽 Dipterucin 等抗菌蛋白^[2-4],但未对家蝇(*Musca domestica*)抗菌肽进行研究;家蝇属昆虫纲,双翅目,环裂亚目、蝇科,是我国大部分地区最常见、数量最多的一种蝇类。家蝇中存在大量抗菌活性物质,对抗菌药物的开发具有重要的意义。但家蝇中抗菌肽的种类较多,成分复杂,提取率低,很难分离纯化,国内学者的研究多停留在免疫血淋巴的阶段,已报道的家蝇抗菌肽均为碱性蛋白^[5-9]。

本文探索并建立了一种高灵敏度的“微量液体检测法”检测抗菌肽的杀菌活性,以野生家蝇蛆为原料,研究了家蝇抗菌肽的抗菌谱、分子量范围、等电点范围等理化性质及抗菌作用机制,并纯化出新的弱酸性家蝇抗菌肽 MD₇₀₉₅。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试蝇蛆:家蝇干蝇蛆(*Musca domestica* larvae)即市售中药“五谷虫”,购于湖北省华城医药有限公司。收集野生家蝇蛆,清洗后晒干,经黄沙焙炒干燥后,过筛除沙,得到家蝇干蝇蛆。

1.1.2 菌株:苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),华中农业大学生命科学与技术学院微生物实验室提供;野生型金黄色葡萄球菌

基金项目:国家自然科学基金(30370647);国家“863 计划”(2002AA214061)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-27-87792027, E-mail: zwchen21@hotmail.com

作者简介:陆 婕(1973-),女,安徽人,讲师,博士,主要从事生物活性肽的分离纯化和性质研究。E-mail: lujie.jane@163.com

其他作者:柳 林¹

收稿日期:2005-08-29;接受日期:2005-12-01;修回日期:2005-12-12

(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母(*Candida albicans*)，由华中科技大学微生物实验室提供；铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由华中科技大学医院提供。

1.1.3 主要试剂：Sephadex G25 fine、CMC23 (Amersham)，丙烯酰胺、双丙烯酰胺、载体两性电解质 (pH3.5~10) (Sigma)，海藻酸 (瑞典 Karolinska 学院赠送)，标准蛋白分子量 (β -galactosidase 116kDa, Bovine Serum albumin 66.2kDa, Ovalbumin 45kDa, Lactate dehydrogenase 35kDa, REase Bsp98I 25kDa, β -lactoglobulin 18.4kDa, Lysozyme 14.4kDa (Fermentas))、小分子量蛋白标准 (本实验室纯化的小肽 Ag1, 分子量 3.7kDa)。其它试剂均为进口分装分析纯。

1.1.4 主要仪器：层析系统 (AKTA prime, Amersham, 瑞典)，微量蛋白质垂直电泳仪 (Mini-PROTEAN 3Cell, Bio-rad, 美国)，电洗脱仪 (Model 422 Electro-Eluter, Bio-rad, 美国)，冻干机 (SNL 315SV Speed Vac, Savant, 美国)，高速冷冻离心机 (GL21M, 英泰, 长沙)，MALDI-TOF-MS 质谱仪 (Micromass, 英国)，扫描电镜 (HITACHI X-650, 日本)。

1.2 蝇蛆抗菌肽粗品提取

500g 干蝇蛆用水浸泡 30min，洗净沥干。用沸水浸泡 10min 后，迅速用自来水冲冷，沥干。加入 4℃ 预冷的 0.5mol/L 乙酸溶液 (1.5L)，匀浆。匀浆液 4℃ 搅拌提取过夜，离心 (6000r/min 40min, 4℃)。上清液 (1.3L) 用滤纸过滤，滤液用 2mol/L 盐酸调 pH 到 2.7，加入 100g 海藻酸，搅拌 30min 4℃ 静置 30min 后，用布氏漏斗抽滤收集吸附了多肽的海藻酸。用 100mL 4℃ 90% 冷乙醇清洗海藻酸滤饼，再用 0.2mol/L 盐酸洗脱，收集洗脱液 (0.57L)，用 NaAc 固体调 pH3.5 后，按 320g/L 加入 NaCl 盐析，搅拌约 20min 后置 4℃ 过夜。在布氏漏斗上收集滤饼，得到 2.2g 蝇蛆抗菌肽粗品。

1.3 Sephadex G25 凝胶过滤

用 0.2mol/L 乙酸充分平衡 Sephadex G25 柱 (26mm × 1000mm) 将样品溶于 15mL 0.2mol/L 乙酸，离心收集上清液上样，用 0.2mol/L 乙酸洗脱。流速 2mL/min 280nm 波长监测，根据洗脱曲线收集洗脱峰，冻干，进行活性检测。

1.4 CMC23 弱阳离子交换柱层析

用 0.01mol/L NH₄HCO₃ (pH8) 充分平衡 CMC23 柱 (26mm × 200mm) 后，将凝胶过滤后得到的活性组

分溶于 15mL 0.01mol/L NH₄HCO₃，用 0.2mol/L 氨水调 pH8，离心，取上清液进一步分离。用 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2mol/L NH₄HCO₃ 和 0.2mol/L 氨水梯度洗脱，流速 1.2mL/min 280nm 波长监测，收集各梯度洗脱峰，冻干进行活性检测。

1.5 抗菌活力检测

采用抑菌圈法^[10]，在混有适量细菌的固体培养基平板上打孔 (直径 1.5mm)，每个孔内加入 3 μ L 待测样品溶液 (100 μ g/ μ L)，37℃ 倒置培养 12h 后测量抑菌圈直径。待测样品均溶于无菌蒸馏水，无菌蒸馏水作为负对照，用 3 μ L 链霉素溶液 (1unit) 作为正对照。

1.6 最低杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC) 测定

采用微量液体检测法，参照最低抑菌浓度测定法改进^[11]。待测样品溶于无菌生理盐水，并作系列二倍稀释，将培养到对数生长期的待测细菌用无菌生理盐水稀释，调整菌液浓度为 2×10^5 CFU/mL，将此菌液与等体积的样品溶液混合均匀，对照用无菌生理盐水代替样品溶液同上操作。37℃ 保温 60min 后，将该混合物取 4 μ L 点种于空白培养基上，室温放置 30min，37℃ 倒置培养过夜。没有长出菌落的对应样品的终浓度即为该样品对该菌的最低杀菌浓度 (用 μ g/ μ L 表示)。

1.7 “微量液体检测法”测定样品杀菌活性

一定浓度的样品与待测菌液混合后，操作方法同 1.6。长出密集菌落的表明该样品无杀菌能力，未长出菌落的说明该样品有杀菌能力。

1.8 抗菌肽的耐热、耐冻融试验

用无菌生理盐水配制一定浓度的蝇蛆抗菌肽溶液，一组分别在 95℃ 保温 0、5、20、30、60、90、120min，冷却到室温后，按“微量液体检测法”测定杀菌能力；另一组分别经 -80℃ 冻融 0、1、2、4、6、8、10 次后，同上述方法测定杀菌能力。对照用无菌生理盐水代替样品溶液，操作同上。

1.9 蛋白质电泳

分离小肽的 Tricine-SDS-PAGE、碱性非变性胶电泳、酸性非变性胶电泳、等电聚焦电泳 (IEF-PAGE)，参照文献 [12] 和 [13] 的方法进行。分离胶浓度为 17%，控制每孔上样量 20 μ g。

1.10 电洗脱回收多肽

蛋白质电泳后，固定、染色，用刀片切下已染色的蛋白带，用 Model 422 Electro-Eluter 电洗脱仪回收目标蛋白带，将目标蛋白放入截留量 3500Da 的透析

袋,置蒸馏水中电磁搅拌透析 24h,将透析袋中的溶液冻干,得到回收多肽。

1.11 质谱测定^[14]

回收多肽经脱盐处理后,直接用 MALDI-TOF-MS 质谱测定分子量。

1.12 肽质量指纹谱(Peptide mass fingerprinting)测定^[14]

将电泳后染色的蛋白带切下,经脱色、胰蛋白酶酶切处理后,提取肽片段用于 MALDI-TOF-MS 质谱分析,并根据数据库检索鉴定蛋白质。

1.13 扫描电镜观察

培养到对数期的苏云金芽孢杆菌用 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.1)洗涤 3 次,并稀释得到终浓度 2×10^7 CFU/mL 的菌悬液。取 0.5mL 菌悬液,加入等体积抗菌肽溶液(使肽终浓度为 $0.078 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ,37℃ 保温 2min 和 20min。加 2mL 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 24h ,7000r/min 离心收集菌体。经 70%、80%、90%、100% 乙醇逐级脱水后,菌体重悬于 20 μL 纯乙醇中,滴加于载物台的玻片上。真空干燥、喷金后,通过 HITACHI X-650 扫描电镜观察抗菌肽对苏云金芽孢杆菌的作用。

2 结果

2.1 家蝇蛆抗菌肽分离

500g 干蝇蛆用海藻酸吸附提取法得到 2.2g 家蝇蛆抗菌肽粗品,得率为 0.44%。进行 Sephadex G25 fine 凝胶过滤,按洗脱峰收集 4 个组分(T1, T2, T3, T4),冷冻干燥,将各组分用抑菌圈法检测抗菌活性,组分 T3 对苏云金芽孢杆菌具有较强的抗菌活性(图 1-A)。300 μg T3 上样到含菌平板,产生的抑菌圈直径 5.0mm,相当于 1unit 链霉素的抑菌活性。将 T3 进行 CMC23 弱阳离子交换柱层析,0.01mol/L NH_4HCO_3 (pH8)洗脱下一个主峰(图 1-B)。将其冻干,检测,能杀灭苏云金芽孢杆菌。该组分在 pH8 的 0.01mol/L NH_4HCO_3 溶液中不与弱阳离子柱结合,说明此组分在 pH8 时净电荷为零或带负电荷。

2.2 家蝇蛆抗菌肽的抗菌谱及最低杀菌浓度

配制 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的家蝇蛆抗菌肽溶液并依次作 2 倍稀释,用“微量液体检测法”测定系列浓度的蝇蛆抗菌肽对 5 种待测菌的杀菌情况。表 1 列出了家蝇蛆抗菌肽对各种菌的最低杀菌浓度,其杀菌活性高低及最低杀菌浓度依次为:枯草杆菌($0.039 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) > 苏云金芽孢杆菌($0.078 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) > 金黄色葡萄球菌($1.25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) > 铜绿假单胞菌($5.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) > 大肠杆菌

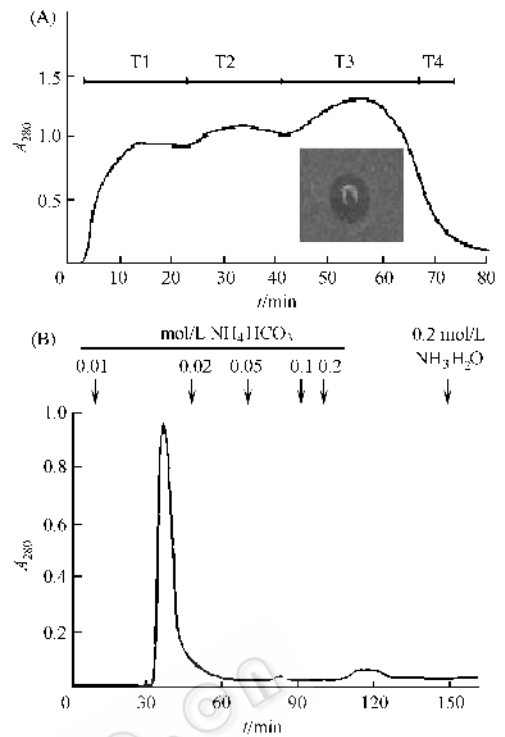


图 1 家蝇蛆抗菌肽层析分离

Fig. 1 Chromatographies of antibacterial peptide. A: Gel filtration chromatography on a Sephadex G25 fine column (26mm \times 1000mm) at flow rate of 1.5mL/min in 0.2mol/L acetic acid, the insert picture showed the inhibitory zone of fraction T3 against *Bacillus thuringiensis* (ϕ 5mm); B Ion-exchange chromatography on CMC23 column (26mm \times 200mm) at flow rate of 1.2 mL/min, eluted in stepwise and only one active fraction was eluted with 0.01mol/L NH_4HCO_3 .

(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。但此蝇蛆抗菌肽组分对真菌(假丝酵母、酿酒酵母)无作用。

表 1 家蝇蛆抗菌肽对不同细菌的最低杀菌浓度

Table 1 The MBC of antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae

Strain	MBC ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Gram-positive bacterium	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.078
<i>Bacillus subtilis</i>	0.039
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25
Gram-negative bacterium	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	20
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND

ND, not detected at the highest concentration tested ($> 100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

2.3 家蝇蛆抗菌肽的耐热、耐冻融能力

配制终浓度 0.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的家蝇蛆抗菌肽溶液,用苏云金芽孢杆菌作检测菌。由图 2 可见,家蝇蛆抗菌肽在 95℃ 保温 120min 和 -80℃ 冻融 10 次后仍能杀灭细菌,具有极强的耐热、耐冻融能力。

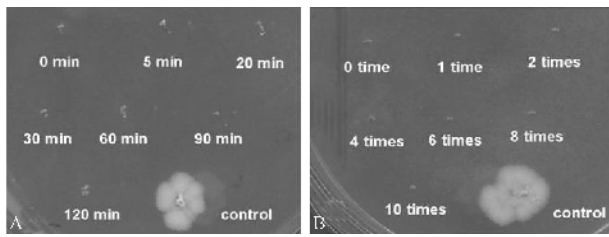


图 2 家蝇蛆抗菌肽耐热、耐冻融能力测定

Fig.2 Test of thermostable and freeze-thaw stable ability of antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae. A :Peptides kept in 95°C for different time ; B :Peptides frozen and thawed in - 80°C for different times.

2.4 家蝇蛆抗菌肽的电泳性质

采用不同的电泳技术鉴定家蝇蛆抗菌肽的分子量及等电点分布。控制每孔上样量 20 μ g ,经 Tricine-SDS-PAGE 检测家蝇蛆抗菌肽分子量主要约 7.9kDa (图 3-A) ,经碱性非变性胶电泳分离出 4 条蛋白带 ,主要是中性和偏酸性蛋白(图 3-B) ,经酸性非变性胶电泳后 ,仅在前沿处有一条清楚的蛋白条带(图 3-C) ,说明碱性蛋白含量很少 ;等电聚焦电泳显示 ,家蝇蛆抗菌肽的主要组分是 pI 值为 5.59 和 5.91 的弱酸性蛋白(图 3-D) ,这与家蝇抗菌肽组分在 pH8 时不与 CMC23 弱阳离子交换柱结合而被直接洗脱的现象相一致 ,说明经海藻酸吸附后提取出的家蝇蛆抗菌肽主要呈弱酸性。分子量和等电点根据文献 [13] 中方法计算 :分子量回归方程 $Y = 0.0132X + 1.8434$ ($r = 0.9945$) , Y 为相应蛋白分子量的对数值 ($\lg Mr$) , X 为蛋白迁移距离 (mm) ,等电点回归方程 $Y = -0.09014X + 10.1950$ ($r = 0.9973$) , Y 为蛋白所在胶的 pH 值 , X 为该蛋白迁移距离 (mm)。

2.5 电洗脱回收家蝇蛆抗菌肽的鉴定

1mg 家蝇蛆抗菌肽经 Tricine-SDS-PAGE 分离后 ,

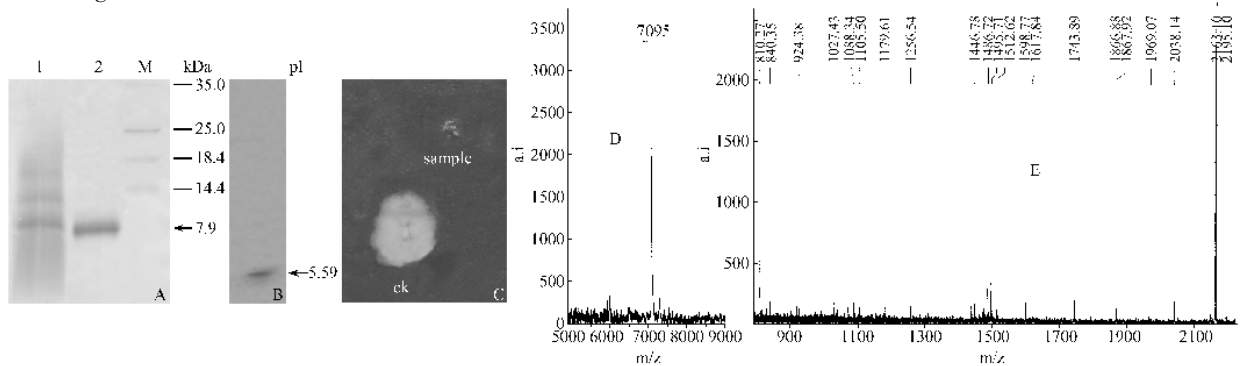


图 4 家蝇蛆抗菌肽 MD₇₀₉₅ 的鉴定结果

Fig.4 Characterization of recovered antibacterial peptide MD₇₀₉₅ from *Musca domestica* larvae. A :Tricine-SDS-PAGE. 1. Antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae ;2. Recovered antibacterial peptide MD₇₀₉₅ ;M. Standard molecular weight ;B :IEF-PAGE ;C :Bactericidal effect to *Bacillus thuringiensis* ;D :MALID-TOF-MS analysis ;E :PMF analysis.

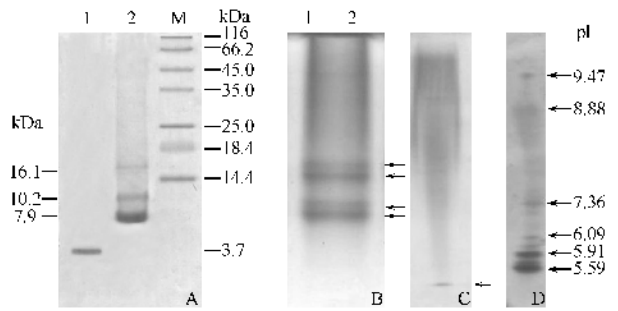


图 3 家蝇蛆抗菌肽的电泳结果

Fig.3 Electrophoresis of antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae. A :Tricine-SDS-PAGE , 1. Peptide AgI ;2. Sample ;M. Standard molecular weight ; B :Alkaline native PAGE ;C : Acid native PAGE ;D : IEF-PAGE.

将各蛋白带电洗脱回收并测定对苏云金芽胞杆菌的杀菌活性。其中分子量最小 ,含量最多的蛋白带回收得到约 500 μ g ,该回收蛋白经 Tricine-SDS-PAGE 鉴定为一单一条带(图 4-A) ,IEF 电泳测得其等电点 5.59 ,是一个弱酸性多肽(图 4-B) ;“微量液体检测法”测得该回收蛋白有杀菌活性(作用终浓度 2.5 μ g/ μ L)(图 4-C) 。经质谱测定其精确分子量 7095Da(图 4-D) ,肽质量指纹图谱(PMF)鉴定其为一个新的生物活性肽(图 4-E) ,根据其来源和分子量命名该抗菌肽为 MD₇₀₉₅。

2.6 扫描电镜观察家蝇蛆抗菌肽对细菌的作用

由于能抑制苏云金芽胞杆菌的抗菌肽报道很少 ,我们用扫描电镜研究了家蝇蛆抗菌肽在最低杀菌浓度(0.078 μ g/ μ L)下对苏云金芽胞杆菌的作用情况。未经抗菌肽处理的苏云金芽胞杆菌杆状结构完整 ,表面光滑(图 5-A) ,经抗菌肽处理仅 2min ,菌体表面形态出现变化 ,有的细胞膜出现较明显的孔洞(图 5-B) 。经抗菌肽处理 20min 后 ,表面出现更多的

孔洞,原生质严重泄漏,菌体破裂(图5-C,D)。扫描电镜提供的形态学证据证明家蝇蛆抗菌肽对苏云

金芽胞杆菌的杀菌机制是在其细菌表面形成穿孔,原生质体泄漏,从而使细菌裂解死亡。

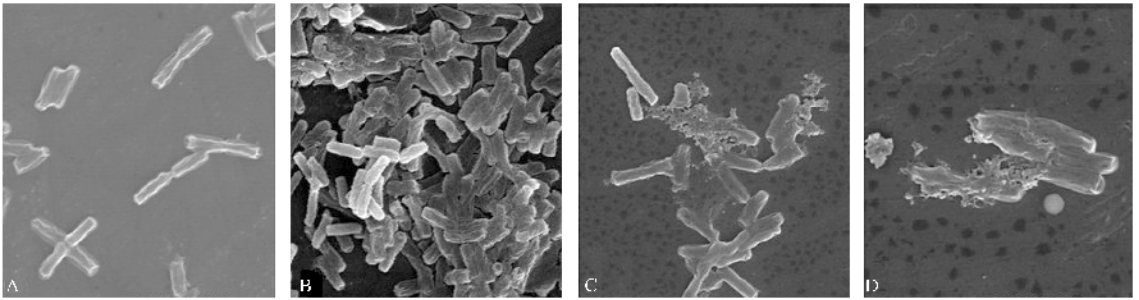


图5 家蝇蛆抗菌肽作用于苏云金芽胞杆菌的扫描电镜观察

Fig.5 SEM micrographs of *Bacillus thuringiensis* untreated or treated with antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae. A: Untreated *Bacillus thuringiensis*; B: Treated for 2 min, bacterial morphology had changed and pores were found at the membrane surface; C, D: treated for 20min, more cell membrane had been perforated and lead to bacterium lysis and die. A, B, C: 5000 \times ; D: 7000 \times .

3 讨论

抗菌肽是生物体受外界病原感染而诱导产生的一类体液免疫物质,野生家蝇生活环境脏,多种诱导源可以诱导产生多种抗菌肽,这样可以大大增加我们找到新抗菌肽的可能性,市售干蝇蛆(即传统中药“五谷虫”)预先经过高温处理,破坏了家蝇蛆中的蛋白酶类,避免抗菌肽被酶降解,同时可以使一些不耐热的大分子蛋白变性,有利于耐热的小分子抗菌肽的提取。在提取过程中仅对样品进行短时沸水处理,未加入蛋白酶抑制剂,避免加入外源物质,并有利于简化抗菌肽分离步骤。

生物活性肽提取过程中往往会遇到原料来源有限,得率低的问题。“海藻酸吸附法”是瑞典Karolinska学院提取小肽的经典方法,经蛋白质电泳证明,海藻酸可有效地吸附小分子量蛋白,使分离过程变得相对容易。分离步骤的简化可大大提高抗菌肽的得率并保持其生物活性。由于机体中生物活性肽的含量很少,故而在分离纯化过程中,样品的活性检测方法的灵敏度往往可以决定能否纯化并鉴定出生物活性肽。抗菌肽的活性检测一般采用“抑菌圈法”或“液相比浊法”,但这两种方法均存在样品需要量大、灵敏度低等缺陷,使得抗菌肽研究进展缓慢。我们参照国家颁布的《消毒剂技术手册》中“最低抑菌浓度测定法”加以改进的“微量液体检测法”不但能够测出抗菌肽的最低杀菌浓度,也能检测抗菌肽的杀菌活性,比抑菌圈法有更高的灵敏度和准确性,这一方法的改进对分离纯化并鉴定抗菌肽有着重要的应用价值。通过这一方法的改进,我们成功地从家蝇蛆中分离纯化得到弱酸性抗菌肽MD₇₀₉₅,经肽质量指纹图谱鉴定其为一个新的生物活性肽。

目前报道的抗菌肽多是带正电荷的偏碱性蛋

白,能与细菌表面的负电物质(如G⁻菌外膜上的脂多糖)相互作用,从而破坏膜结构以发挥抗菌作用。而G⁺菌没有脂多糖膜,只能通过表面肽聚糖中的胞壁酸、糖醛酸等带少量负电荷,这可能是多数抗菌肽对G⁻菌比对G⁺菌抗性更强的原因^[15]。已报道的家蝇血淋巴抗菌肽均呈弱碱性和中性,而酸性蛋白组分没有抗菌能力(王远程等^[7,9]),但我们从家蝇中提取的蝇蛆抗菌肽主要是弱酸性蛋白,抗菌谱广。纯化出的新抗菌肽MD₇₀₉₅分子量7095Da,等电点5.59,目前我们已鉴定其N端40个氨基酸序列,经数据库检索为一富含甘氨酸的新抗菌肽,其抗菌机制不是由于抗菌肽与细菌表面的静电作用,而是与其特殊的甘氨酸结构域密切相关(见另文报道)。

宫霞等^[16]报道家蝇抗菌肽MDL-1能杀灭大肠杆菌,其作用机制是破坏细菌细胞膜。我们分离的弱酸性家蝇抗菌肽也是通过使细胞膜穿孔的方式杀灭苏云金芽胞杆菌,其作用机制相同。但本研究中弱酸性家蝇抗菌肽对大肠杆菌作用效果差,其一级结构必定与MDL-1有差异。目前国内外研究中,能抑制苏云金芽胞杆菌的抗菌肽报道很少,仅柏鸣等^[9]报道一个富含脯氨酸的碱性蛋白对苏云金芽胞杆菌有抑制作用(分子量约12.6kDa, pI约9.8,未测得其一级结构,未研究其抗菌机制),可见家蝇抗菌肽确实种类繁多。

由于抗菌肽的生物活性实验用量较大,我们准备用分子生物学方法制备大量的MD₇₀₉₅后再进行系统的研究。目前,临床上用于G⁺菌的抗生素较少,且极易产生耐药性反应,家蝇抗菌肽抗菌活性高、抗菌谱广、有杀灭G⁺菌的活性,具有极强的耐热、耐冻融能力,深入研究家蝇抗菌肽,对开发新的抗菌药物有着重要的意义和广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropis*. *Eur J Biochem*, 1980, **106**: 7-16.
- [2] Okada M, Natori S. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrine* (fresh-fly) larvae. *J Biochem*, 1983, **211**: 727-734.
- [3] Baba K, Okada M, Natori S. Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrine* (fresh-fly) larvae. *Biochemistry*, 1987, **26**: 226-230.
- [4] Dimarq J, Keppi E, Dunbar B. Purification and characterization of family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterin A. *Eur J Biochem*, 1988, **171**: 17-22.
- [5] 周永富, 饶军华, 黄自然. 家蝇抗菌物质的诱导. 生物学杂志, 1997, **14**(3): 23-26.
- [6] 饶军华. 家蝇免疫血淋巴的性质研究. 昆虫天敌, 1999, **21**(3): 121-125.
- [7] 王远程, 左晓峰, 孙东旭, 等. 家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质. 微生物学报, 1997, **37**(2): 148-153.
- [8] 宫 霞, 乐国伟, 施用晖, 等. 电泳制备家蝇幼虫抗菌肽及其性质. 无锡轻工大学学报, 2003, **22**(6): 25-38.
- [9] 柏 鸣, 周 立. 家蝇抗菌蛋白的部分结构信息及生物学活性. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**(5): 633-637.
- [10] 李秀兰, 戴祝英, 张双全. 抗菌肽琼脂糖孔穴扩散法与比浊法测活比较及其相关性. 南京师大学报(自然科学版), 1998, **21**(2): 81-83.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范. 第一版. 河北省廊坊市安次区光达纸塑制品厂, 2002.
- [12] Hermann S, Gebhard Von J. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kD. *Analytical Biochemistry*, 1987, **166**: 368-379.
- [13] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [14] 杨泓原, 钱小红, 盛龙生. 生物质谱技术与方法. 第一版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [15] Robert EWH. Peptide antibiotics. *The Lancet*, 1997, **349**: 418-422.
- [16] 宫 霞, 施用晖, 乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL-1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响. 昆虫学报, 2004, **47**(1): 8-13.

Purification and characterization of weak-acid antibacterial peptide MD₇₀₉₅ from *Musca domestica* larvae

LU Jie¹, WANG Jun-han², ZHONG Ya¹, ZHAO Yan-ying¹, CHEN Zheng-wang^{1*}

¹ Institute of Biophysical & Biochemistry, College of Life Science and Technology,

² Subsidiary Hospital, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract *Musca domestica*, which belongs to insecta, diptera, cyclorrhapha, muscidae, is the most common muscae and the richest resource. It is very significant and valuable to isolate antibacterial peptides from *Musca domestica* and to develop these peptides into antibacterial medicine. Due to purify a pure peptide from the natural materials (animal, plant and microorganism tissue) is very difficult and complex, few research is going on. It had been reported that the most antibacterial peptides from *Musca domestica* were alkaline, no weak-acid antibacterial peptides had been reported so far. Based on a high sensitivity detection method, using dilute acetic acid extraction, alginic acid absorption, NaCl salting-out, Sephadex G-25 gel filtration, CMC23 ion-exchange chromatography, electrophoresis, a group of weak-acid antibacterial peptides had been purified from *Musca domestica* larvae and partial characterized. The peptides had characters of broad antibacterial spectrum and low minimum bactericidal concentration against Gram-positive bacterium such as *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacterium such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. The peptides were very stable to keep the antibacterial activity even kept in 95°C for 120min and frozen-thawed for 10 times. A weak-acid antibacterial peptide MD₇₀₉₅ had been purified in high degree of purity by electro-elution, and was determined Mr 7095Da with MALDI-TOF-MS and pI 5.59 with IEF-PAGE. Peptide mass fingerprinting (PMF) analysis showed MD₇₀₉₅ was a novel bioactive peptide. Few peptides with antibacterial activity against *Bacillus thuringiensis* had been reported. Observation by scanning electron microscopy (SEM), it was suggested that the bioactivity mechanism of antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae against *Bacillus thuringiensis* was to perforate cell membrane and lead to bacterium lysis and die. It is hopeful to develop the antibacterial peptides from *Musca domestica* to candidate medicine.

Keywords: *Musca domestica* larvae; Antibacterial peptide; Antibacterial activity; Scanning electron microscopy; Cell membrane perforation

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund(30370647), Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2002AA214061)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-27-87792027; E-mail: zwchen21@hotmail.com

Other author: LIU Lin¹

Received 29 August 2005/Accepted 1 December 2005/Revised: 12 December 2005