

## 研究简报

## 蚯蚓两种抗菌肽的分离纯化及部分性质\*

张希春<sup>1)</sup> 孙振钧<sup>1)\*\*</sup> 糕如朋<sup>2)</sup> 侯全民<sup>3)</sup> 林桂秋<sup>4)</sup><sup>1)</sup> 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; <sup>2)</sup> 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;<sup>3)</sup> 中国科学院生物物理研究所, 百奥药业有限公司, 北京 100101; <sup>4)</sup> 中日友好医院, 北京 100103)

**摘要** 经硫酸铵沉淀、超滤、阳离子交换分离和反相快速蛋白质液相色谱 (FPLC) 分析, 得到了两种新的蚯蚓抗菌肽 F-1 与 F-2, 经电喷雾离子源质谱 (ESI-MS) 测定, 其相对分子质量为 535.27 和 519.27. 串联质谱 (MS/MS) 数据表明 F-1 的肽序列为 Ac-Ala-Met-Val-Ser-Ser, F-2 的肽序列为 Ac-Ala-Met-Val-Gly-Thr. 最小抑菌浓度 (MIC) 实验表明, F-1 与 F-2 对鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas pyocyanea*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、土生克雷伯氏菌 (*Klebsiella terrigena*) 的最小抑菌浓度分别为 11.4 mg/L 和 12.85 mg/L, 对粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 的最小抑菌浓度分别为 22.8 mg/L 和 25.68 mg/L. 对真菌白色念珠菌 (*Candida albicans*) 没有表现为完全的抑制作用.

**关键词** 蚯蚓, 抗菌肽, 分离纯化, 氨基酸序列

**学科分类号** Q516

蚯蚓经过长期的进化逐渐形成了抵抗外来微生物侵袭的机制, 自身可产生一些抗菌成分. Milochau<sup>[1]</sup> 从蚯蚓体液中分离到了两种分子质量为 40 ku 和 45 ku, 具抗菌、溶血和凝血功能的蛋白质命名为 Fetidins; Beschin<sup>[2]</sup> 也发现了分子质量为 42 ku 的体腔细胞溶解因子 (CCF-1), 具溶血作用, 在蚯蚓抗微生物侵袭方面发挥一定作用; 另外, Chao 等<sup>[3]</sup> 从蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 中得到抗菌肽 Lumbricus I, 体外实验表明有广谱的抗菌活性, 而在 100 mg/L 时也没有溶血活性. 以上研究表明蚯蚓的确拥有有效的抗菌成分, 在当前抗生素使用泛滥, 抗药性细菌不断增多的背景下, 如果能以蚯蚓的生态适应为理论基点, 通过生化分离方法筛选到抗药性小而活性强的抗感染药物, 无疑有重要意义.

## 1 材料和方法

### 1.1 蚯蚓与菌株

蚯蚓 *Eisenia fetida* 来自中国科学院生物物理研究所百奥药业有限公司人工养殖洗净后冻存的蚯蚓. 菌株白色念珠菌 (*Candida albicans*), 土生克雷伯氏菌 (*Klebsiella terrigena*), 鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*), 绿脓杆菌 (*Pseudomonas pyocyanea*), 鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*), 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*), 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus*

*aureus*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 卡他布兰汉氏球菌 (*Branhamella catarrhalis*), 粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*), 产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 均由中日友好医院提供.

### 1.2 主要仪器及试剂

仪器: 超滤杯系统 (颇尔-格尔曼, 美国); 高速低温离心机 (Hitachi CR21, 日本); 冷冻干燥机 (FTS SYSTEM<sup>TM</sup>, TDS-3D-MP, Revco, 德国); Bruker ESQUIRE<sub>LC</sub>/MS 液相色谱-质谱联用仪; MIC 空白板及对应的接种器 (天津金章医用新技术研究所); Pharmacia FPLC 系统, SP-Sepharose Fast Flow; Pro RPC<sup>TM</sup> HR 5/10 预装柱 (Pharmacia, 瑞典). 试剂: 三氟乙酸 (TFA), 乙腈.

### 1.3 抗菌肽的分离纯化

**1.3.1 粗样品的制备:** 将蚯蚓用 0.02 mol/L (pH 6.0) 磷酸缓冲液 (PB) 匀浆后离心, 取上清并计算 30% 饱和度所需要的固体硫酸铵量, 研细后于 4℃ 缓慢加入, 离心收集上清. 接着加入 60% 饱和度所需要的固体硫酸铵, 重复上述操作并收集沉淀. 用分子质量截留为 1 ku 的超滤杯超滤, 获得分子质量小于 1 ku 的粗组分, 取少量进行抗菌

\* 国家自然科学基金 (39770105, 30270195), 国家计委 2001 年生物技术产业化专项 (蚓激酶系列产品及蚯蚓产业化工程) 和高等学校博士点基金资助项目 (98103).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62892942, E-mail: zjsun@ht.rol.cn.net

收稿日期: 2002-03-26, 接受日期: 2002-05-10

活性检测, 方法见 1.4.4.

**1.3.2 阳离子交换分离:** 阳离子交换剂 SP-Sepharose Fast Flow, 缓冲液 A 为 0.01 mol/L 乙酸铵缓冲液 (pH 5.45), 缓冲液 B 为 1.0 mol/L 乙酸铵缓冲液 (pH 5.45). 用缓冲液 A 平衡, 上样后用缓冲液 A 洗脱到出现基线, 而后进行梯度洗脱, 0%~100% B 洗脱 300 ml. 收集各峰并取少量进行抗菌活性检测, 方法见 1.4.4.

**1.3.3 反相快速蛋白质液相色谱 (FPLC) 分析:** Pharmacia FPLC 系统, Pro RPCTM HR 5/10 预装柱, 缓冲液 A 为 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液, 缓冲液 B 为 0.085 TFA/70% 乙腈 (乙腈: 水为 70:30). 0%~50% B 洗脱 40 ml (或 0%~30% B 洗脱 24 ml). 洗脱后的样品真空干燥.

**1.4 抗菌肽的部分性质鉴定**

**1.4.1 分子质量及纯度鉴定:** 电喷雾离子源质谱 (ESI-MS) 测分子质量及纯度<sup>[4,5]</sup>.

Bruker ESQUIRE\_ LC/MS 液相色谱-质谱联用仪, 用水将样品溶解后直接上样, 从 50.00 (*m/z*) 到 2000 (*m/z*) 扫描.

**1.4.2 氨基酸序列测定:** 串联质谱 (MS/MS) 法<sup>[5]</sup>. Bruker ESQUIRE\_ LC/MS 液相色谱-质谱联用仪, 用水将样品溶解后直接上样, 电喷雾离子源.

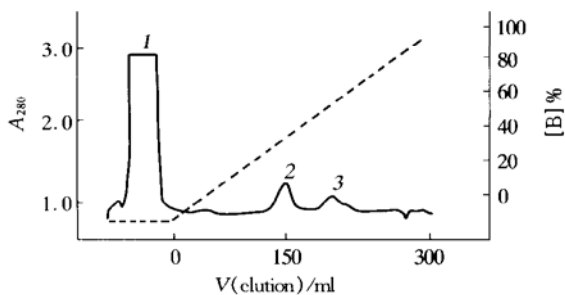
**1.4.3 茚三酮反应:** 蛋白质液 4 滴, 0.1% 茚三酮乙醇溶液 2 滴混溶, 沸水浴 1~2 min, 冷却后观察颜色变化.

**1.4.4 抗菌谱检测:** 微量稀释法<sup>[6]</sup>. 参照天津金章医用新技术研究所 MIC 试剂盒说明书.

**2 结果与讨论**

**2.1 分离纯化**

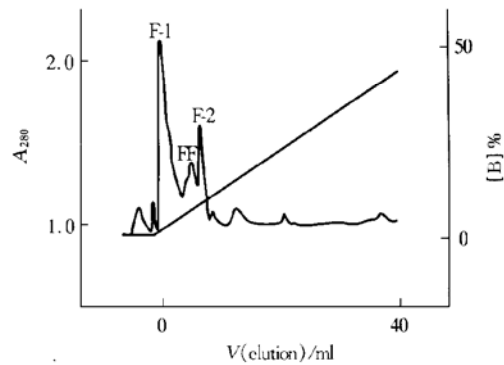
**2.1.1 粗样品的制备及阳离子交换分离:** 抗菌实



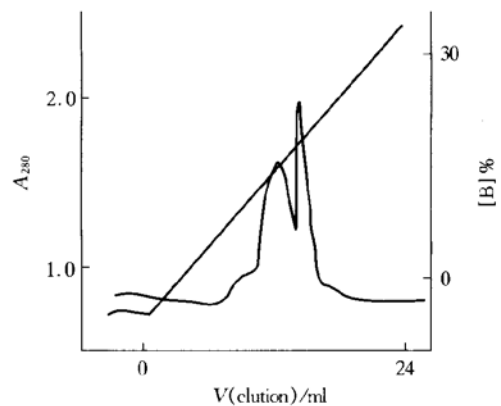
**Fig 1 Chromatography of the active fraction with SP-Sepharose Fast Flow 16/30**

验表明, 60% 饱和度的硫酸铵沉淀分子质量 < 1 ku 的蛋白质粗组分, 对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、粘质沙雷菌、产酸克雷伯菌有抗菌活性, 该组分经阳离子交换后的结果见图 1, 活性存在于峰 2, 对卡他布兰汉氏球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯氏菌有抗菌活性.

**2.1.2 反相 FPLC 分析:** 阳离子交换分离得到的峰 2 经 FPLC 分析, 记录显示有三个峰 (图 2), 分别命名为 F-1、FF 和 F-2. 以相似条件对 FF 进行 FPLC 分析表明, FF 又可以分成两个峰 (图 3), 分别命名为 F-1' 和 F-2', 进一步的质谱分析表明 F-1 与 F-1', F-2 与 F-2' 是相同的组分 (图 4), 即峰 FF 既包含 F-1, 也包含 F-2.



**Fig 2 Chromatography of active fraction on FPLC**



**Fig 3 Chromatography of FF on FPLC**

F-1 与 F-2 的分子质量都小于 1 ku. 在相同的缓冲液梯度中从阳离子交换柱中洗脱出来, 这说明 F-1 与 F-2 的等电点、离子特性非常相似. 在 FPLC 分析中, F-1 与 F-2 是临近的两个峰, 之间还有 F-1 与 F-2 的混合物 FF, 这说明 F-1 与 F-2 的疏水特性也极为相似. 综上所述, 分离纯化的结果

表明 F-1 与 F-2 是在离子特性和疏水特性等方面非常相似的两种活性成分。

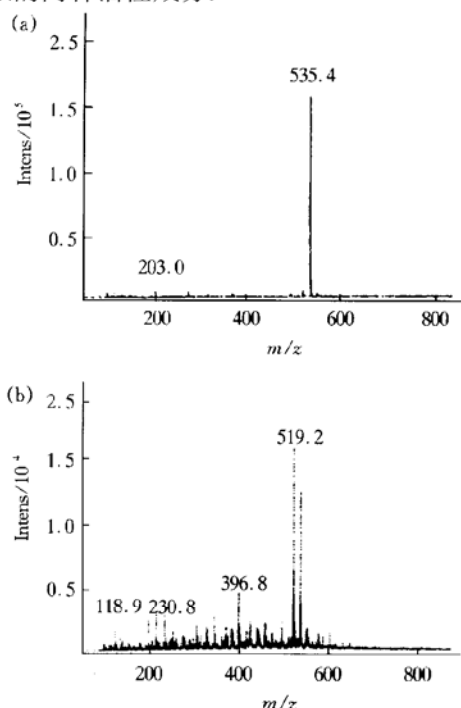


Fig. 4 Analysis of F-1 (F-1') and F-2 (F-2') with ESI-MS

(a) F-1 (F-1'); (b) F-2 (F-2').

## 2.2 抗菌肽的部分性质鉴定

### 2.2.1 纯度及分子质量测定: 只要质量有差异的杂

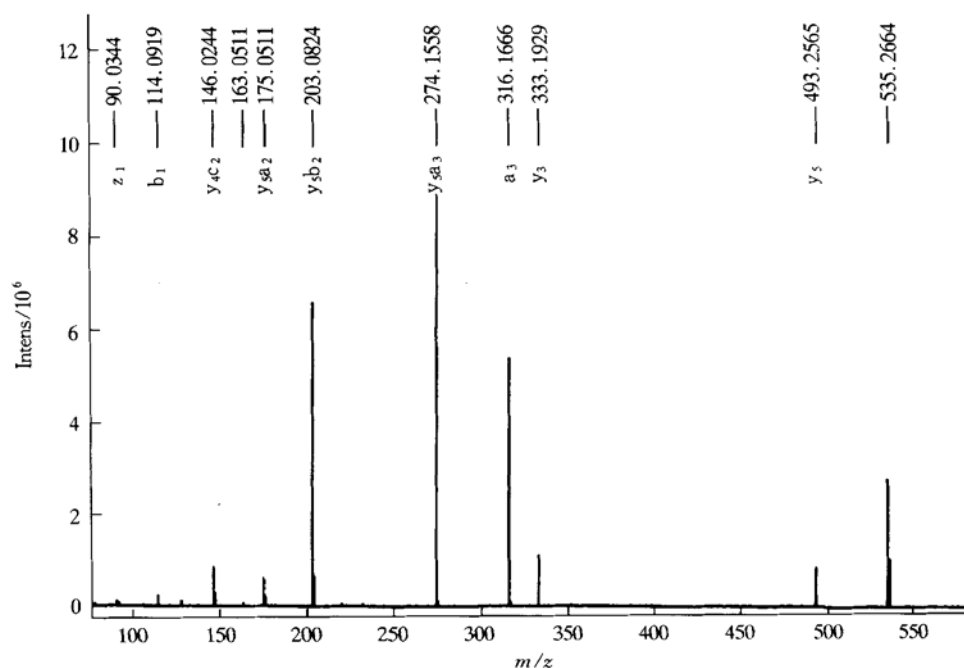


Fig. 6 MS/MS spectrum of F-1

The internal fragment which is formed by a combination of two types of cleavages is labelled with the two letters which are used to classify the ion type.

质都可以用质谱法检测出来, 灵敏度高且用量少。F-1 与 F-2 的质谱分析表明 F-1 与 F-2 已经得到了纯化。用 ESI-MS 测定多肽的相对分子质量精确度可达 0.1% ~ 0.01%, 远比其他方法 (如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、凝胶过滤、超离心等) 精确。F-1 与 F-2 的相对分子质量为 535.27 和 519.27 (图 4)。

2.2.2 氨基酸序列测定: 利用串联质谱技术 (MS/MS), 从图 6 和图 7 的质谱分析中获得了肽的结构信息。图 5 为 MS/MS 中可能的碎片离子形式。

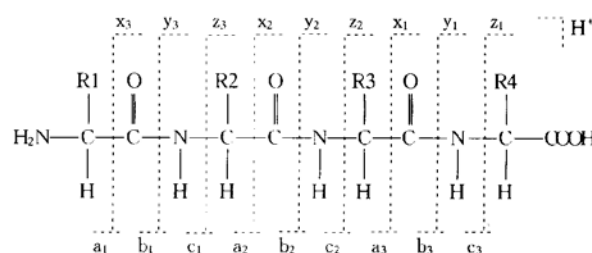


Fig. 5 The types of fragment ions observed in MS/MS spectrum. The fragment ion which charge is retained on the N terminal is classed as either a, b or c. If on the C terminal, the ion type is either x, y or z. A subscript indicates the number of residues in the fragment.

F-1 包含丙氨酸 (Ala)、甲硫氨酸 (Met)、缬氨酸 (Val) 和两个丝氨酸 (Ser), 5 个氨基酸残基的分子质量之和为 493.26, 现加一个乙酰基 (Ac 42), 正好为 F-1 的相对分子质量 535.27, 证明该肽被乙酰基所封闭。F-2 的 MS/MS 质谱分析表明, F-2 包

含丙氨酸 (Ala)、甲硫氨酸 (Met)、缬氨酸 (Val)、甘氨酸 (Gly) 和苏氨酸 (Thr), 5 个氨基酸残基的分子质量之和为 477.26, 现加一个乙酰基, 正好为 F-2 的相对分子质量 519.27, 证明该

肽被乙酰基所封闭. 图 6 的质谱数据证明 F-1 的肽序列为 Ac-Ala-Met-Val-Ser-Ser. 图 7 的质谱数据证明 F-2 的肽序列为 Ac-Ala-Met-Val-Gly-Thr.

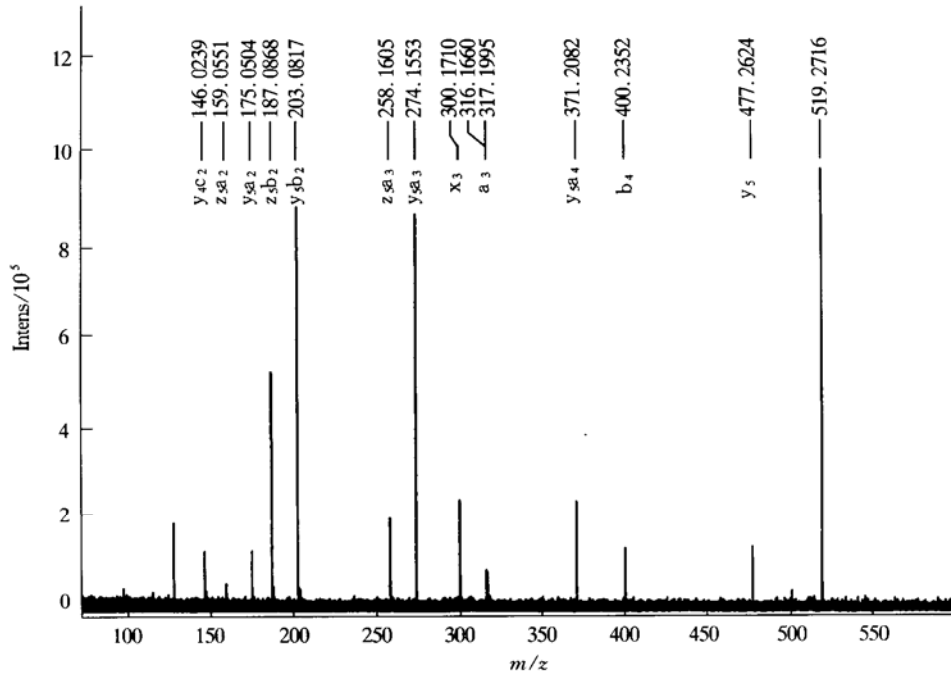


Fig. 7 MS/MS spectrum of F-2

F-1 与 F-2 的 N 端均被乙酰基所封闭, N 端的 3 个氨基酸残基 (丙氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸) 相同. F-1 的 C 端是两个丝氨酸残基, 而 F-2 是甘氨酸和苏氨酸残基, 丝氨酸、甘氨酸和苏氨酸都是不带电荷的极性 R 基氨基酸. 可见 F-1 与 F-2 有很高的同源性.

**2.2.3 茚三酮反应:** F-1 与 F-2 的茚三酮反应呈阴性, 进一步说明 N 端被乙酰基封闭.

**2.2.4 抗菌谱测定:** F-1 与 F-2 对革兰氏阳性菌、阴性菌和真菌都有一定抑制作用 (表 1). F-1 对鹌鸡肠球菌、绿脓杆菌、鲍氏不动、土生克雷伯的最小抑菌浓度为 11.4 mg/L, 对粪肠球菌的最小抑菌浓度为 22.8 mg/L, F-2 对鹌鸡肠球菌、绿脓杆菌、鲍氏不动杆菌、土生克雷伯氏菌的最小抑菌浓度为 12.85 mg/L, 对粪肠球菌的最小抑菌浓度为 25.68 mg/L, 可见 F-1 与 F-2 能在很小的浓度下对革兰氏阳性菌和阴性菌产生抑制作用, 这与其他生物中分离到的抗菌肽非常相似<sup>[7]</sup>. 有关蚯蚓方面的研究也有相似的结果, Chao<sup>[3]</sup>用微量稀释法, 对蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 产生的抗菌肽 Lumbricus I 的最小抑菌浓度做了检测, Lumbricus I 对革兰氏阳性菌

杆菌 *Bacillus subtilis*、葡萄状球菌 *Staphylococcus aureus*、链球菌 *Streptococcus mutans* 的最小抑菌浓度分别为 12 mg/L、16 mg/L、30 mg/L, 对革兰氏阴性菌埃希氏杆状菌 *Escherichia*、假单胞菌 *Pseudomonas putida*、沙雷氏菌 *Serratia sp* 的最小抑菌浓度分别为 12 mg/L、12 mg/L、16 mg/L, 对真菌假丝酵母 *Candida albicans*、隐球酵母 *Cryptococcus neoformans*、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的最小抑菌浓度分别为 16 mg/L、25 mg/L、12 mg/L. F-1 与 F-2 与 Lumbricus I 一样能在很低的浓度下产生抑菌作用, 且具广谱性.

F-1 与 F-2 对真菌白色念株菌在实验条件下没有表现为完全的抑制作用. 但下结论认为 F-1 与 F-2 对真菌的抑制作用要弱于对革兰氏阳性菌和阴性菌的作用还为时过早, 一方面因为选择的测试菌只有白色念株菌一种, 另外, 对真菌所用的 MIC 检测条件如培养基和孵育温度、时间等条件都与细菌所用的条件一样, 这对结果的判定也有一定影响.

不同的抗菌肽对革兰氏阳性菌和阴性菌的作用有所不同<sup>[7,8]</sup>, 如 Cecropins 对革兰氏阳性菌和阴

性菌都有强的作用, 而 Cecropin P1 对革兰氏阳性菌的作用与 Cecropins 相当, 对革兰氏阴性菌的作

用则较弱. F-1 与 F-2 对实验中所用的革兰氏阳性菌和阴性菌都有强的作用, 没有表现出差别.

**Table 1** Antibacterial activity of F-1 and F-2

	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>
A	+	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	+	-
D	+	++	+	++	+	++
a	+	-	-	-	-	-
b	+	-	-	-	-	-
c	+	-	-	-	+	-
d	+	++	+	++	+	++

Different mass concentration of F-1. A: 46.7 mg/L, B: 22.8 mg/L, C: 11.4 mg/L, D: 5.7 mg/L. Different mass concentration of F-2. a: 52.6 mg/L, b: 25.68 mg/L, c: 12.58 mg/L, d: 6.42 mg/L. +++: the same with that of contrast, ++: remarkably less than contrast, +: growing little, -: no growing.

目前, 虽然纯化得到了两种蚯蚓抗菌肽, 但仍然有许多问题需要阐明, 如其行使功能时的高级结构、功能发挥所需要的条件及其使用的安全剂量等都需要进一步研究, 以获得将蚯蚓抗菌肽开发为新一代抗感染药物所必须了解的信息.

**致谢** 感谢中国科学院生物物理研究所百奥药业有限责任公司在科研经费等方面的支持.

### 参 考 文 献

- Milochau A, Lassegues M. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial protein from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1337** (1): 123~132
- Beschin A, Bilej M, Hanssens F, et al. Identification and cloning of a glucan and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia fetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem*, 1998, **273** (38): 24948~24954
- Chao J H, Park C B. Lumbricin I, a novel proline rich

- antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1408** (1): 67~76
- 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社, 1997. 105~111
- Xia Q C. Technology and Development of Protein Chemistry. Beijing: Science Press, 1997. 105~111
- Kamp R M, Choli Papadoupoulou T, Wittmann-Liebold B. Protein structure analysis: preparation, characterization and microsequencing. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1997. 86~90
- 陈秀枢, 屠勇涛. 微量肉汤稀释法检测 MIC 的评价. *中华医学检验杂志*, 1994, **17** (2): 95~98
- Chen X S, Tu Y T. The Journal of Chinese Medicine Analysing, 1994, **17** (2): 95~98
- 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展. *生物工程进展*, 1999, **19** (5): 14~17
- Zhao D H, Dai Z Y, Zhou K Y. Development of Bioengineering, 1999, **19** (5): 14~17
- 陈留存, 王金星. 昆虫抗菌肽研究现状. *生物工程进展*, 1999, **19** (5): 55~60
- Chen L C, Wang J X. Development of Bioengineering, 1999, **19** (5): 55~60

## Purification and Characterization of Two Antibacterial Peptides From *Eisenia fetida*\*

ZHANG Xi-Chun<sup>1)</sup>, SUN Zhen-Jun<sup>1)\*\*</sup>, ZHUO Ru-Peng<sup>2)</sup>, HOU Quan-Min<sup>3)</sup>, LIN Gui-Qiu<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Resource and Environmental College, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

<sup>2)</sup> Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>3)</sup> Baiao Pharmaceuticals Co. Ltd., Beijing 100101, China; <sup>4)</sup> China and Japan Friendship Hospital, Beijing 100103, China)

**Abstract** Two novel antibacterial peptides were isolated and characterized from the earthworm *Eisenia fetida*. The antibacterial peptides were purified to homogeneity by means of cation-exchange chromatography and reverse FPLC and named F-1 and F-2. By means of ESI-MS, F-1 and F-2 were determined to be two peptides with the relative molecular mass of 535.27 and 519.27. By means of MS/MS, the amino acid sequence of F-1 and F-2 were determined to be Ac-Ala-Met-Va-Ser-Ser and Ac-Ala-Met-Va-Gly-Thr respectively. F-1 and F-2 exhibited an antibacterial activity not only to bacteria but also to fungi. Minimal inhibitory concentration (MIC) of F-1 and F-2 against several Gram-positive and Gram-negative bacteria were determined by incubating approximately  $10^4 \sim 10^5$  CFU/ml of cell with serial dilutions of peptide in a 96-well microtiter plate. The MIC of F-1 and F-2 against *Enterococcus gallinarum*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella terrigena*1 were 11.4 mg/L and 12.85 mg/L. The MIC of F-1 and F-2 against *Enterococcus faecalis* was 22.8 mg/L and 25.68 mg/L.

**Key words** *Eisenia fetida*, antibacterial peptides, purification, characterization

\* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39770105, 30270195), Industrialization of Biotechnology from State Development Planning Commission in 2001 and DPF1 of High Education Program (98103).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62892942, E-mail: zjsun@ht.rol.cn.net

Received: March 26, 2002 Accepted: May 10, 2002