

绵羊生殖道抗菌肽*

陈琛^{1, 2)} 王新华¹⁾ 薄新文^{1)**}

(¹⁾新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000; ²⁾陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723000)

摘要 以屠宰场收集的新鲜、健康、雌性绵羊生殖器官为原材料, 采用乙酸浸提、透析、Sephadex G-50 凝胶过滤层析和反相高效液相色谱(RP-HPLC)等方法分离纯化绵羊生殖道抗菌肽。以 G⁺、G⁻和真菌为抗菌活性检测指示菌株, 利用薄层琼脂糖孔穴扩散法、微量肉汤稀释法进行抗菌活性检测。对分离纯化所得纯品进行分子质量质谱测定、纯度鉴定、N 端测序, 并对其性质进行研究。结果表明: 分离纯化所得两个绵羊生殖道抗菌肽分子质量分别为 4820.47 u 和 4012.5 u, N 端部分氨基酸序列分别为 AYVLDEPKP 和 YDSGA。对 G⁺ 细菌(*S. aureus* ATCC2592、*Streptococcus* ATCC55121)、G⁻ 细菌(*E. coli* ATCC25922)、真菌(*C. albicans* ATCC2002)均具有良好的抑菌活性。对家兔红细胞无溶血活性, 对人血液凝固无影响。目前未见有从绵羊生殖道分离纯化得到抗菌肽的报道, 并且这一研究结果进一步证实抗菌肽在多种动物生殖道天然免疫防御方面起着重要作用。

关键词 绵羊, 抗菌肽, 分离纯化, 最小抑菌浓度, 色谱
学科分类号 Q518

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00011

抗菌肽(antibacterial peptide, ABP)是生物细胞特定基因编码产生的一类小分子多肽, 是宿主防御病原微生物入侵的重要分子屏障^[1]。与传统抗生素相比, 抗菌肽具有分子质量小、热稳定好、水溶性好、强碱性、广谱抗菌和作用机制独特等特点, 在医药卫生、畜牧业、食品防腐剂等方面有广阔的应用前景, 故从不同的机体或同一机体的不同组织中分离纯化具有抗菌活性的多肽是动物学、植物学、药理学、生物化学研究的一个热点^[2~4]。现已从哺乳动物、昆虫、两栖动物、植物、细菌等中发现近千种抗菌肽^[5], 它们广泛存在于昆虫, 植物的花、果、叶, 动物免疫系统(如吞噬细胞)及各种动物皮肤、脏器的黏膜^[6]。动物的皮肤、黏膜直接与外界大量微生物接触, 是病原体入侵的门户, 皮肤黏膜中大量的抗菌肽起到了“天然抗生素”的作用, 构成生物体防御的第一道屏障^[7, 8]。这些抗菌肽在生殖道上皮细胞、鼻黏膜和部分正常支气管黏膜、消化道黏膜等细胞中存在固有表达, 还可因炎症、感染和细胞恶性转化等因素的刺激而表达、分泌上调^[9, 10]。临床资料表明, 近年来女(雌)性生殖系统炎症, 如外阴阴道炎、宫颈炎、盆腔炎等呈现明显增加趋势, 居妇科疾病之首, 严重影响女(雌)性健康, 子宫感染甚至可危及到胎儿的生长发育。随着

细菌耐药株的不断出现, 寻找新型的抗菌药物越来越被重视, 从生殖系统中分离纯化新的抗菌蛋白不仅有利于对雌性生殖道天然免疫防御机制的了解, 同时也可能具有潜在的开发应用价值。

目前已研究报道的绵羊抗菌肽包括 3 类共 11 种, 这 3 类分别是: 上皮细胞的 β -防御素(β -defensin)、骨髓细胞的 cathelicidins、绵羊肺部表面活性物质阴离子抗菌肽(SAAPs)。到目前为止, 这 11 种绵羊抗菌肽中 cathelicidins 类的 SMAP29 和 SMAP34 已经人工化学合成, OaBac5 从绵羊嗜中性粒细胞中分离纯化, SAAPs 从绵羊肺部分离纯化, 而其他 7 种均为克隆得到的 cDNA 序列, 还没有得到相应的蛋白质, 故没有对其理化性质和生物活性进行研究^[11]。至今未见到有关绵羊生殖道抗菌肽的相关报道, 本研究首次从绵羊生殖道中分离纯化、鉴定了两个绵羊生殖道抗菌肽, 并对所分离的抗菌肽生化性质和生物活性进行了研究。

* 新疆兵团科技局基础研究项目(2006JC01)。

** 通讯联系人。

Tel: 0993-2553235, E-mail: Boxinwen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-05, 接受日期: 2009-05-09

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料. 健康、新鲜、雌性绵羊生殖系统来自石河子清真活畜屠宰厂.

1.1.2 供试菌株. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC2592、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922、白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC2002 均来源于昆明医学院; 链球菌 *Streptococcus* ATCC55121 来源于吉林大学农学部.

1.1.3 主要试剂. Sephadex G-50 介质为 Pharmacia 公司产品; 乙腈为 Fisher 公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇、四甲基乙二胺 (TEMED) 等为 BBI 公司产品; 溴酚蓝、过硫酸铵、三羟甲基氨基甘氨酸 (Tricine) 为 Amresco 产品; SDS 为 Promega 公司产品; Bradford 蛋白质定量试剂盒为普利莱基因技术有限公司产品; 其他试剂均为国产分析纯.

1.1.4 仪器设备. 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); 3K30 高速冷冻离心机 (Sigma 公司); 冷冻干燥机 (LABCONCO 公司); Model 550 酶标仪 (Bio-Rad 公司); Mini-protein III 垂直电泳槽 (Bio-Rad 公司); Lambda Bio 4.0 紫外 / 可见分光光度计 (PE 公司); 氨基酸测序仪 (ABI 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 绵羊生殖道抗菌肽粗品提取. 屠宰场采集健康、新鲜、雌性绵羊生殖器官置于冰浴中带回实验室清洗, 去脂、系膜, 称重, 参照文献[12~15]方法进行以下处理. 将 100 g 子宫组织剪碎成 1 cm² 的小块, 10 000 r/min 匀浆, 每匀浆 30 s, 停止 20 s, 重复 3 次, -20℃ 冻融 3 次, 超声波细胞破碎仪破碎细胞. 按 1:2 加入 5% 乙酸 4℃ 搅拌浸提 24 h, 然后将浸提混合物在高速冷冻离心机上 14 500 r/min, 4℃ 离心 30 min, 收集上清液测定蛋白质浓度, 透析, 冷冻干燥, -20℃ 低温保存, 即为绵羊生殖道抗菌肽粗品提取物. 取少量粗提品重新溶解在 0.01% 乙酸中用于检测活性.

1.2.2 凝胶过滤色谱. 将粗提品重悬在 0.01% 乙酸缓冲液中, 10 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清上样于事先用 5 倍柱床体积的乙酸铵平衡好的 Sephadex G-50 柱 (2.6 cm × 100 cm), 用 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲液 (pH 6.0) 进行洗脱, 流速 18 ml/h, 用自动部分收集仪收集于试管中, 3 ml/管. 整个洗脱过程在 4℃ 环境中进行, 在 280 nm 处检测洗脱

峰, 收集、冷冻干燥, 测定蛋白质浓度, 将蛋白质重新溶解在 0.01% 乙酸缓冲液中, 采用琼脂糖孔穴扩散法进行抑菌活性实验, 每组做 3 个平行, 并重复 2 次, 以 0.01% 乙酸为对照.

1.2.3 高效液相色谱纯化. 经凝胶过滤色谱纯化后有活性的样品进一步用反相高效液相色谱进行分离纯化. 将凝胶过滤色谱纯化的活性样品重新溶解在 0.01% 乙酸缓冲液中, 离心取上清, 上样于 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液平衡好的 Hypersil BDS C18 RP-HPLC 柱 (0.46 cm × 30 cm). 以水: 乙腈构成的洗脱系统进行梯度洗脱, 60 min 内乙腈浓度由 0% 升至 42%, 洗脱速度 0.7 ml/min. 在 215 nm 和 280 nm 处检测洗脱峰, 收集冷冻干燥, 测定蛋白质浓度、检测每一个峰的抗菌活性.

1.2.4 抗菌活性检测. 分离纯化中各步样品活性监测示踪采用薄层琼脂糖孔穴扩散法^[6], 有抑菌活性圈形成的收集峰表明有抗菌活性, 进一步测定最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), 测定方法采用美国临床实验标准化委员会 (NCCLS) 推荐的 Hancock 方法^[17, 18].

1.2.5 溶血活性和血浆凝固活性检测. 溶血活性检测参考文献[19], 血浆凝固活性检测参照文献[20]进行.

1.2.6 蛋白质浓度测定. 采用 Bradford 法^[21], 以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 为标准蛋白.

1.2.7 分子质量测定. 粗提及凝胶过滤色谱样品采用 Tris-Tricine-SDS-PAGE (Schagger 方法^[22]) 并加以改进, 浓缩胶 3%, 夹层胶 10%, 分离胶 16.5%. 纯品分子质量利用 MALDI-TOF-MS 测定.

1.2.8 纯度鉴定. 分离纯化得到纯品采用 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 鉴定. 用 HPLC 对分离纯化得到的绵羊生殖道抗菌肽进行纯度鉴定, 事先用 10 倍柱体积的乙腈 / TFA 溶液体系, 乙腈浓度由 0% ~ 100% 和 100% ~ 0% 反复冲洗柱子, 保证柱子中的杂质及吸附的蛋白质被彻底清洗. 将 RP-HPLC 纯化得到绵羊生殖道抗菌肽溶解在 0.01% 乙酸缓冲液中, 10 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清 10 μl 上样于 C18 柱, 以水: 乙腈构成的洗脱系统进行梯度洗脱, 120 min 内乙腈浓度由 0% 升至 40%, 洗脱速度 0.7 ml/min. 在 215 nm 和 280 nm 处检测洗脱峰.

1.2.9 N 端氨基酸序列测定. 采用 Edman 降解法在 Applied Biosystems Model 476A Protein Sequencer 上测序.

1.2.10 绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性影响因素分析.

- a. 温度对抗菌肽抗菌活性的影响. 将绵羊生殖道抗菌肽分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 水浴锅中加热 30 min, 自然冷却至室温测定 MIC.
- b. pH 值对抗菌肽抗菌活性的影响. 测定绵羊生殖道抗菌肽在 pH 5~pH 9 不同 pH 条件下的 MIC.
- c. 盐离子浓度对抗菌肽抗菌活性的影响. 测定绵羊生殖道抗菌肽在 0、50、100、250 mmol/L NaCl 浓度下的 MIC.

2 结 果

2.1 绵羊生殖道抗菌肽分离纯化

绵羊生殖道组织用 5%乙酸粗提, 离心, 过夜浸提, 透析, 冷冻干燥后得到淡黄色粉末. 少量重新溶解在 0.01%乙酸中进行 Tris-Tricine-SDS-PAGE

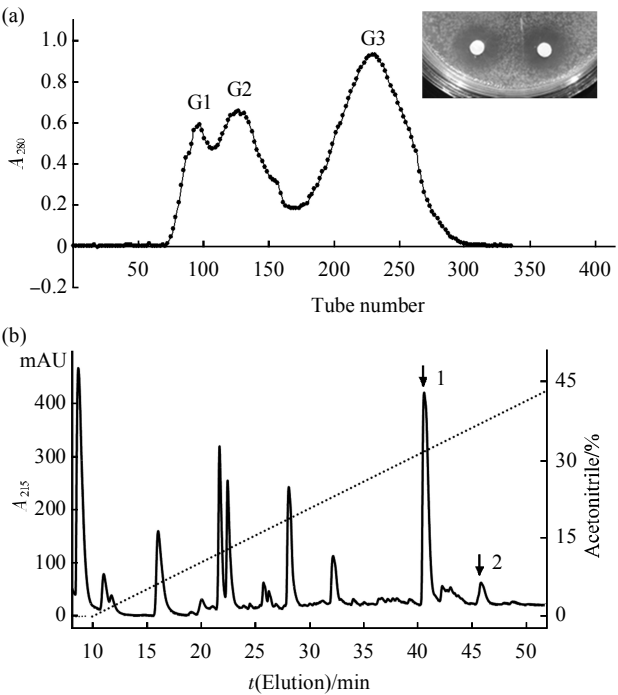


Fig. 1 Fractionation of sheep reproductive tract
(a) Sephadex G-50 gel filtration of extraction from sheep reproductive tract. The extraction from sheep reproductive tract was applied on a Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, 2.6 cm × 100 cm) column equilibrated with 0.1 mol/L ammonium acetate buffer, pH 6.0. Elution was performed with the same buffer, collecting tubes of 3.0 ml. Inset: Antibacterial activity of the G3 fraction. (b) The G3 peak with antimicrobial activity from Sephadex G-50 was further purified on a Hypersil BDS C18 RP-HPLC column (30 cm × 0.46 cm) equilibrated with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid/water. The elution was performed with the indicated gradient of acetonitrile in (b) at a flow rate of 0.7 ml/min, and fractions were tested for antimicrobial activity. The purified antimicrobial peptides are indicated by 1, 2, respectively (b).

分析, 发现有小分子质量的电泳条带产生. 抗菌活性检测表明, 对 *S. aureus*、*Streptococcus*、*E. coli*、*C. albicans* 均有不同程度的抑菌效果. 粗提品进行下一步纯化.

凝胶过滤色谱进行分离纯化所得的洗脱曲线见图 1a, 绵羊生殖道抗菌肽粗提物经过凝胶过滤色谱进行初步分离得到 3 个峰, 分别标记为 G1、G2、G3, 收集各峰、冷冻干燥, 琼脂糖孔穴扩散法进行抑菌活性实验, 其中 G1、G2 和对照 0.01% 乙酸对 4 株供试菌株无抑菌活性, 而 G3 峰对 *S. aureus*、*Streptococcus*、*E. coli*、*C. albicans* 均有较强的抑菌活性. 图 1a 右上角为 G3 峰对 *C. albicans* 薄层琼脂糖孔穴扩散法抑菌活性效果, G3 峰进行下一步纯化.

将具有抗菌活性的 G3 峰进一步利用 RP-HPLC 进行分离纯化, 结果如图 1b 所示. 当洗脱至 40 min 和 45 min 时, 出现的 2 个峰具有抗菌活性 (抗菌肽 1, 抗菌肽 2, 图 1b 中用箭头标示). 由图 1b 可知 G3 峰中蛋白质成分较多, 主要色谱峰集中在 9~47 min.

绵羊生殖道抗菌肽经各步分离纯化产率见表 1. 从 100 g 绵羊生殖道组织中经过粗提、透析、凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱最后分离纯化得到 6.4 mg 纯品.

Table 1 Summary of purification of antibacterial peptide from sheep reproductive tract

Fraction	m(Yield)/mg
Crude extract	4 953.0
Dialysis	3 185.0
Sephadex G-50	216.6
RP-HPLC	6.4

From 100 g female sheep reproductive tract.

2.2 抗菌活性检测

抑菌试验发现, 分离纯化得到的绵羊生殖道抗菌肽对于革兰氏阳性细菌(*S. aureus*、*Streptococcus*)、革兰氏阴性细菌(*E. coli*)、真菌(*C. albicans*)均具有抑菌活性. 微量肉汤稀释法测定绵羊生殖道抗菌肽对 4 株供试菌株的最小抑菌浓度结果见表 2.

2.3 溶血和血浆凝固活性检测

对分离纯化得到的 2 个绵羊生殖道抗菌肽的溶血活性进行了检测. 结果表明, 抗菌肽对家兔红细胞没有溶血活性. 血浆凝固活性试验结果, 2 个绵羊生殖道抗菌肽均无凝血活性.

Table 2 MIC of antibacterial peptides from sheep reproductive tract

Microorganism	MIC/(mg/L)*	
	ABP 1	ABP 2
Gram-positive bacteria		
<i>S. aureus</i> ATCC2592	12 ± 2	5 ± 1
<i>Streptococcus</i> ATCC55121	24 ± 0	20 ± 2
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> ATCC25922	12 ± 0	10 ± 2
Fungus		
<i>C. albicans</i> ATCC2002	6 ± 0	5 ± 1

*These concentrations represent mean values of three independent experiments performed in duplicates.

2.4 分子质量测定

抗菌肽是分子质量在 4 ku 左右的小分子多肽, 在实验过程中测定是否有小分子质量条带, 可为进一步分离纯化提供参考依据. 实验中采用 Tris-Tricine-SDS-PAGE 对粗提物、凝胶过滤色谱有抗菌活性的收集峰的分子质量进行分析, 结果粗提物可见多条小于 14 ku 的条带, 凝胶过滤色谱活性峰也清晰呈现几条小分子质量条带.

经过 RP-HPLC 后的绵羊生殖道抗菌肽采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 进行分子质量测定, 绵羊生殖道抗菌肽 1 的分子质量是 4 820.47 u (图 2), 绵羊生殖道抗菌肽 2 的分子质量为 4 012.53 u.

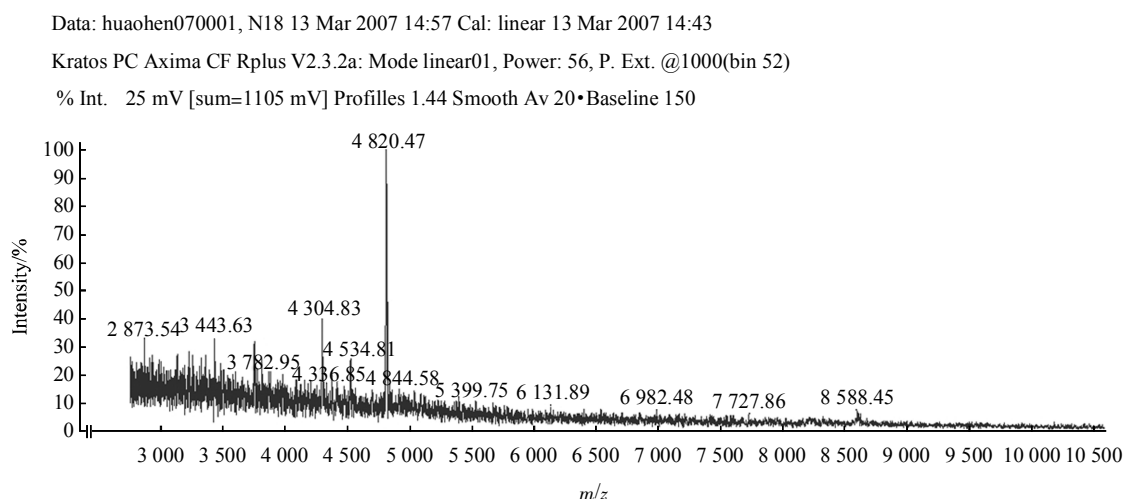


Fig. 2 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of antibacterial peptide 1 from sheep reproductive tract

2.5 纯度鉴定

纯度鉴定的目的是评价分离纯化的效果, 并给纯化得到的纯品蛋白质或多肽末端氨基酸测序提供

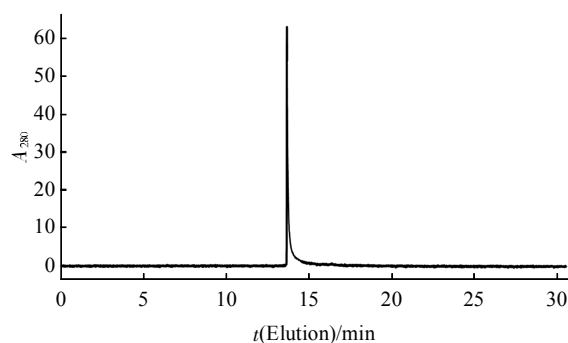


Fig. 3 The purity identification of antibacterial peptide 1 from sheep reproductive tract

一个参考. 用 HPLC 对分离纯化得到的绵羊生殖道抗菌肽 1 进行纯度鉴定, 洗脱梯度较分离纯化缓慢. 当洗脱至 13.5 min 时出现单一的洗脱峰, 洗脱直至 120 min 再未出现任何洗脱峰 (图 3 显示前 30 min), 并且该峰出现后保留时间极短, 仅仅保留 40 s 左右, 说明纯化得到的该抗菌肽在极性上相同, 即单一. 其次是采用 MALDI-TOF-MS 进行纯度鉴定, 结果同分子质量测定.

2.6 N 端氨基酸序列测定

用 Edman 降解法对绵羊生殖道抗菌肽其 N 端序列进行测定, 绵羊生殖道抗菌肽 1 的 N 端序列为 AYVLDEPKP. 绵羊生殖道抗菌肽 2 的 N 端序列为 YDSGA. 通过 BLAST 检索没有发现相同的蛋白质, 我们推测可能是 2 个新的抗菌肽.

2.7 绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性影响因素分析

2.7.1 温度对绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性的影响.

绵羊生殖道抗菌肽 1 和 2, 在不同温度下处理后测定抗 *C. albicans* 的 MIC, 结果见图 4. 由图 4 可知, 抗菌肽分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 加热处理 30 min 后抗菌活性没有受到影响, 仍具有较强的抗菌活性. 而 80℃、90℃、100℃ 处理 30 min 后对其抗菌活性影响较明显, 并随着加热温度的提高抗菌活性逐渐减弱, 但是即使 100℃ 处理 30 min, 抗菌活性仍没有完全被破坏.

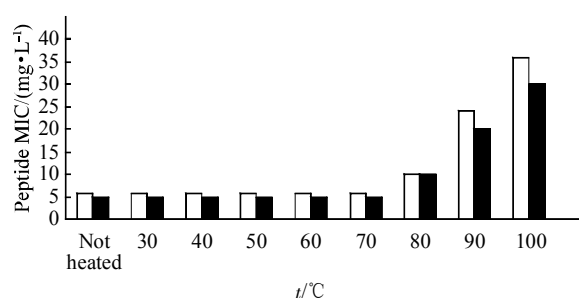


Fig. 4 The effect of temperature on the minimal inhibitory concentration(MIC) of antibacterial peptides from sheep reproductive tract against *C. albicans* ATCC2002
□: Peptide 1; ■: Peptide 2.

2.7.2 pH 值对绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性的影响. 两个绵羊生殖道抗菌肽在中性溶液条件下对 *C. albicans* 抗菌活性最好, 碱性条件下较酸性条件抗菌活性差, 这可能是酸性条件与抗菌肽在泌尿生殖道生理条件下的酸性环境比较吻合, 使其发挥了较强的抗菌活性(图 5).

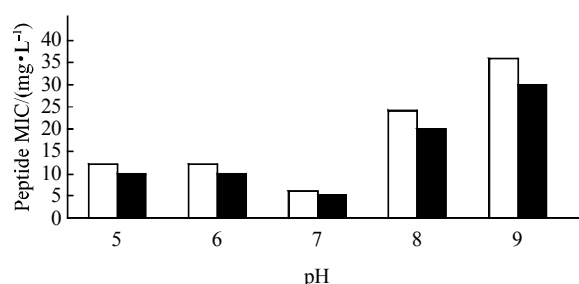


Fig. 5 The effect of solution pH on the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial peptides from sheep reproductive tract against *C. albicans* ATCC2002
□: Peptide 1; ■: Peptide 2.

2.7.3 盐离子浓度对绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性的影响. 盐离子浓度对绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性影响非常大, 当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时绵羊生殖道抗菌肽对 *C. albicans* 的 MIC 是 NaCl 浓度

0 mmol/L 时的 4 倍, 即抗菌活性减少为未加盐离子时的 1/4. 两个绵羊生殖道抗菌肽随着 NaCl 浓度的增加, 抑菌活性依次减小(图 6).

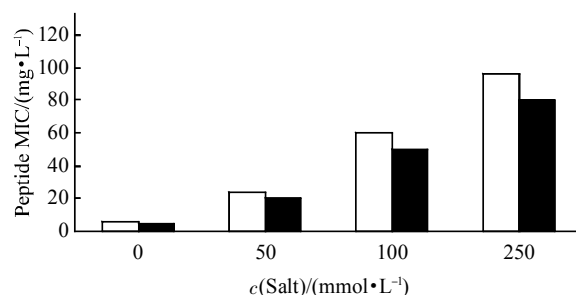


Fig. 6 The effect of salt concentration on the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial peptides from sheep reproductive tract against *C. albicans* ATCC2002
□: Peptide 1; ■: Peptide 2.

3 讨 论

近年来, 由于抗生素的滥用, 药物残留和细菌耐药性等问题日渐严重, 从而引发了人们对食品安全的关注, 越来越多的国家开始呼吁禁用抗生素, 而抗菌肽因其独特的生物活性以及不同于抗生素的特殊作用机理, 已引起人们极大的研究兴趣, 成为分子生物学和生物化学研究领域的热点之一. 2002 年, Valore 等^[23]对女性阴道液体抗菌组分进行了深入调查和研究, 发现其中有一个很重要的组分是生殖道上皮细胞来源的人 β -防御素(human β -defensins, HBD), 同年, Hein 等^[24]对女性宫颈黏液进行了研究调查得出和 Valore 相同的研究结果. 2003 年, King 等^[25]报道人的子宫内膜能产生抗菌肽, 这些抗菌肽的产生是受月经周期的支配, 中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所张永莲研究小组发现, 大鼠附睾头部上皮细胞中特异表达具有抗菌功能的多肽基因^[26], 由此推测, 可能在其他哺乳动物的生殖系统也存在抗菌肽, 我们的研究结果首次证实绵羊生殖系统中存在抗菌肽.

多肽是一种很容易失活的活性物质, 影响其活性的因素较多, 在分离纯化过程中为了保持多肽的抗菌活性, 样品采集后运输保存、粗提、分子筛层析均在 4℃ 冷库中进行以确保试验的成功. 蛋白质粗提时材料的处理方法、提取液、提取 pH 值、提取次数等进行正交试验设计, 最终确定了抗菌肽粗提方法. 在粗分离试验中采用 Merck 公司 Fractogel® EMD DEAE 离子交换材料进行分离,

但未能取得成功,可能是因为绵羊生殖道中抗菌肽为阳离子性质,而作为阴离子交换材料的 DEAE 不适合用于绵羊生殖道中抗菌肽分离. Fractogel® EMD DEAE 材料分离失败后将粗分离柱材料改为 Sephadex G-50 凝胶过滤,精分离利用 RP-HPLC,从而建立较完善的绵羊生殖道抗菌肽的分离纯化工艺.

本研究中,抗菌活性试验表明,分离纯化的 2 个绵羊抗菌肽对 G^+ 、 G^- 和真菌都有抗菌活性,但是对真菌(*C. albicans* ATCC2002)的抗菌效果比细菌更好,绵羊生殖道抗菌肽 2 抑制链球菌的 MIC (20 mg/L) 是白色念珠菌 (5 mg/L) 的 4 倍. 而 Anderson 对绵羊血液来源的嗜中性粒细胞 OaBac5,骨髓细胞来源的 SMAP29、SMAP34 的研究结果则是抗细菌的效果优于抗真菌效果^[27, 28]. 溶血活性是抗菌肽研究及临床开发应用中的一个重要方面, Skerlavaj 等^[29]对化学合成的 SMAP29 溶血活性研究表明, SMAP29 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 时对人红细胞的溶血率为 67%,而我们研究发现绵羊生殖道抗菌肽对家兔红细胞无溶血活性,这可能是绵羊生殖道抗菌肽来源于天然分离纯化.

对绵羊生殖道抗菌肽抗菌活性影响因素,如温度、pH 值、盐离子浓度进行研究. 绵羊生殖道抗菌肽能耐一定的高温,当温度达到 80℃ 时抗菌效果有较小的影响,当达到 90℃ 以上时对抗菌效果影响较明显,这与其他研究结果一致^[30]. 抗菌肽抗菌活性受盐离子影响较大, Goldman 等^[31]研究证实并在 Cell 上发表论文, HBD-1 是一个盐敏感的抗菌肽,高盐浓度下 HBD-1 抗铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 的抗菌活性急剧下降. 甚至有一些抗菌肽,如 α -、 β -defensins 和 OaBac5 盐离子浓度达到 100 mmol/L 时就会迅速失去作用效果^[32, 33]. 但是,对绵羊生殖道抗菌肽研究发现,当 NaCl 浓度增加至 100 mmol/L 时抗菌活性没有完全消失.

本实验样品来源是健康绵羊生殖系统,不存在疾病或炎症,即没有受病原体刺激,故推测该抗菌肽可能存在于绵羊生殖道上皮细胞并呈持续、固有表达,且构成了绵羊生殖道上皮细胞天然抗菌防御屏障,而且这一研究结果进一步证实,抗菌肽在多种动物生殖道天然免疫防御方面起着重要作用. 对分离纯化得到 2 个绵羊生殖道抗菌肽性质进行了研究,为进一步探讨抗菌肽在绵羊生殖道的抗菌作用机理奠定了基础,也为绵羊生殖道抗菌肽应用于治疗生殖道疾病和其他细菌性疾病创造了可能性.

致谢 感谢中国科学院昆明动物研究所动物模型和人类疾病机理实验室赖仞研究员在实验中的指导.

参 考 文 献

- 1 Bowdish D M, Davidson D J, Hancock R E. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, **6**(1): 35~51
- 2 Boman H G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 2003, **254**(3): 197~215
- 3 Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(3): 238~250
- 4 陈 琛, 王新华, 薄新文, 等. 哺乳动物上皮细胞抗菌肽分离纯化研究进展. *动物医学进展*, 2006, **27**(11): 29~33
Chen C, Wang X H, Bo X W, *et al.* *Prog Vet Med*, 2006, **27**(11): 29~33
- 5 Seebah S, Suresh A, Zhuo S, *et al.* Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**: D262~268
- 6 Kamysz W. Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics?. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 2005, **8**(1): 78~86
- 7 Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al.* A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 1997, **388**(6641): 416
- 8 Nizet V, Ohtake T, Lauth X, *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, 2001, **414**(6862): 454~457
- 9 Bevins C L, Martin-Porter E, Ganz T. Defensin and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 1999, **45**(6): 911~915
- 10 Quayle A J, Porter E M, Nussbaum A A, *et al.* Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproduction tract. *Am J Pathol*, 1998, **152**(5): 1247~1258
- 11 陈 琛, 王新华, 薄新文, 等. 绵羊抗菌肽研究进展. *生物技术通报*, 2007, : 36~39
Chen C, Wang X H, Bo X W, *et al.* *Biotech Bul*, 2007, (2): 36~39
- 12 Tanabe H, Yuan J, Zaragoza M M, *et al.* Paneth cell alpha-defensins from rhesus macaque small intestine. *Infect Immun*, 2004, **72**(3): 1470~1478
- 13 陈正望, 蔡小丽, 顿新鹏. 狗小肠新生物活性肽的分离纯化及结构测定. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2005, **33**(8): 87~89
Chen Z W, Cai X L, Dun X P. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 2005, **33**(8): 87~89
- 14 肖向红, 徐义刚, 柴龙会. 中国林蛙皮肤抗菌活性肽的分离提取. *东北林业大学学报*, 2005, **33**(1): 44~46
Xiao X H, Xu Y G, Chai L H. *Journal of Northeast Forestry University*, 2005, **33**(1): 44~46
- 15 马卫明, 余锐萍, 彭芳珍, 等. 猪小肠抗菌肽的提取及部分生物学活性研究. *科学技术与工程*, 2004, **4**(3): 202~205
Ma W M, She R P, Peng F Z, *et al.* *Science Technology and Engineer*, 2004, **4**(3): 202~205
- 16 Steinberg D A, Lehrer R I. Designer assays for antimicrobial peptides. In: Shafer WM, ed. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 78: *Antimicrobial Peptide Protocols*. Totowa NJ: Humana Press Inc., 1997. 169~186
- 17 Hancock R E W. Hancock Laboratory: Methods [EB/OL]. <http://www.interchg.ubc.ca/both/MIC.htm>, 2001-11-27
- 18 Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, *et al.* *In vitro* susceptibility

- tests for cationic peptides: comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically. *Antimicro Agents Chemo*, 2000, **44**(6): 1694~1696
- 19 Bignami G S. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon*, 1993, **31**(6): 817~820
 - 20 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 834~839
 - Xu S Y, Bian R L, Chen X. The Pharmacology Experiment Method. Beijing: People's Medical Publishing House. 1982. 834~839
 - 21 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1~2): 248~254
 - 22 Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Anal Biochem*, 1987, **166** (2): 368~397
 - 23 Valore E V, Park C H, Igreti S L, *et al.* Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, **187**(3): 561~568
 - 24 Hein M, Valore E V, Helmig R B, *et al.* Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, **187**(1): 137~144
 - 25 King A E, Critchley H O, Kelly R W. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, (1): 116
 - 26 Peng Li, Chan H C, He B, *et al.* An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science*, 2001, **291** (5509): 1783~1785
 - 27 Anderson R C, Yu P L. Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**(4): 1139~1146
 - 28 Anderson R C, Hancock R E, Yu P L. Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine-derived cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(2): 673~676
 - 29 Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, *et al.* SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett*, 1999, **463**(1~2): 58~62
 - 30 Anderson R C, Yu P L. Factors affecting the antimicrobial activity of ovine-derived cathelicidins against *E. coli* 0157 : H7. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, **25**(3): 205~210
 - 31 Goldman M J, Anderson G M, Stolzenberg E D, *et al.* Human b-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in the lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 1997, **88**(4): 553~560
 - 32 Travis S M, Anderson N N, Forsyth W R, *et al.* Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun*, 2000, **68**(5): 2748~2755
 - 33 Shamova O, Brogden K A, Zhao C, *et al.* Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect Immun*, 1999, **67**(8): 4106~4111

Antibacterial Peptides of The Ovine Reproductive Tract*

CHEN Chen^{1,2)}, WANG Xin-Hua¹⁾, BO Xin-Wen^{1)*}

⁽¹⁾ The Breed & Biotechnology Key Laboratory of Sheep in Reproduction & Construction Group of Xinjiang, Shihezi 832000, China;

⁽²⁾ College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract The female sheep reproductive tracts were freshly collected from a local meat processing plant and used as experimental materials. Two antibacterial peptides were isolated and characterized from female sheep reproductive tracts by two consecutive chromatographic steps. The peptide isolation procedures included acetic acid extraction, dialyzed, gel filtration chromatography on Sephadex G-50, and reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Their molecular mass were 4 820.47 u and 4 012.5 u, respectively, analyzed by MALDI-TOF-MS. The partial N-terminal amino acid sequences of two peptides were determined as AYVLDEPKP and YDSGA, respectively, by Edman degradation. The antimicrobial activity was tested during each purification step by the radial diffusion plate assay and broth microdilution method. These two peptides showed good antimicrobial activities against reference strains of G⁺ (*S. aureus* ATCC2592 and *Streptococcus* ATCC55121), G⁻ (*E. coli* ATCC25922) and fungi (*C. albicans* ATCC2002). The peptides did not show active hemolytic activity against rabbit blood red cells and had no significant effects on human blood coagulation system. The discovery of antibacterial peptides in sheep reproductive system reveals that antibacterial peptides may play a role in innate immunity against microorganisms in a wide range of animal species.

Key words sheep, antibacterial peptide, isolation and purification, MIC, chromatography

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00011

*This work was supported by a grant from The Basic Program of Xinjiang Production and Construction Corps Science and Technique Bureau(2006JC01).

**Corresponding author. Tel: 86-993-2553235, E-mail: Boxinwen@yahoo.com.cn

Received: April 5, 2009 Accepted: May 9, 2009