

DOI:10.14188/j.ajsh.2018.06.011

野生大黑蚁中抗菌肽类物质的分离纯化及其耐热性

李仁奇¹,任桂君¹,王志平²,于川²,喻勇²,杨洁¹,张佳雨¹,林骏²,许波²,
叶新^{1*}

(1. 四川理工学院,四川 自贡 643000;
2. 自贡白蚁防治科学研究所,四川 自贡 643000)

摘要:以野生大黑蚁为原料,采用索氏抽提法除脂后,经乙醇浸提法粗提,再利用透析法分离纯化,得到对细菌具有抑制作用的抗菌肽类物质,并对该抗菌肽类物质进行氨基酸分析和耐热性检测。结果表明:分离得到的抗菌肽类物质对枯草芽胞杆菌具有抑制作用,其抑菌圈直径为24 mm;结合索氏抽提除脂,乙醇浸提和透析法所得到的粗提物氨基酸含量较高;蚂蚁抗菌肽类物质表现出较高的热稳定性,80 °C下加热50 min后抑菌活性下降。

关键词: 蚂蚁;抗菌肽;氨基酸;耐热性

中图分类号: Q514

文献标识码: A 文章编号: 2096-3491(2018)06-0536-06

Isolation, purification and heat resistance of antibacterial peptides from *Polyrhachis vicina* Roger

LI Renqi¹, REN Guijun¹, WANG Zhiping², YU Chuan², YU Yong², YANG Jie¹, ZHANG Jiayu¹,
LIN Jun², XU Bo², YE Xin^{1*}

(1. Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, Sichuan, China;
2. Zigong Termite Control Science Research Institute, Zigong 643000, Sichuan, China)

Abstract: The wild black ant *Polyrhachis vicina* Roger was used as raw material, which was degreased by Soxhlet extraction. After crude extraction by ethanol, it was separated and purified by dialysis method to obtain antimicrobial peptides with antibacterial effect. Amino acid analysis and heat resistance detection of the antimicrobial peptide substances were performed. The results showed that the isolated antibacterial peptide had an inhibitory effect on *Bacillus subtilis*, and the diameter of its bacteriostasis was 24 mm. The ant antibacterial peptide obtained by Soxhlet extraction combined with ethanol extraction and dialysis had higher amino acid content, and showed higher thermal stability, the antibacterial activity decreased after heating at 80 °C for 50 min and more.

Key words: ant; antimicrobial peptide; amino acid; heat resistance

0 引言

抗菌肽是生物防御系统产生的一类对抗外源性病原体的小分子肽类物质^[1],最早发现的抗菌肽来自植物的硫素,试验表明它可在体外抑制细菌和真

菌的生长。较早引起人们广泛关注的抗菌肽是天蚕素^[2],它是一种通过阴沟通杆菌及大肠杆菌的诱导,由惜古化天蚕蛹产生的一种具有抗菌活性的多肽物

收稿日期: 2018-09-16 修回日期: 2018-11-02

作者简介: 李仁奇(1996-),本科生,研究方向为生物化学, E-mail: 1483662143@qq.com

*通讯联系人: 叶新(1985-),讲师,博士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yexinxy@suse.edu.cn

基金项目: 四川省2017大学生创业创新项目(201710622083); 四川理工学院横向项目(HX2015018)

引用格式: Li R Q, Ren G J, Wang Z P, et al. Isolation, purification and heat resistance of antibacterial peptides from *Polyrhachis vicina* Roger [J]. Biotic Resources, 2018, 40(6): 536-541.

李仁奇,任桂君,王志平,等. 野生大黑蚁中抗菌肽类物质的分离纯化及其耐热性[J]. 生物资源, 2018, 40(6): 536-541.

质。在细菌、真菌、两栖类、高等植物、哺乳动物及人类中也陆续发现多种性质类似的抗菌肽^[3,4]。近年来,国内外在抗菌肽方面的研究取得了很大进展,其高效的抗菌活性和独特的作用机制,使其有望成为抗生素最理想的替代品^[5]。抗生素的滥用会导致耐药性细菌的加速进化^[6],与作用于细胞壁的传统抗生素相比,抗菌肽作用于细胞膜,不存在耐药性和变异等问题^[7]。

蚂蚁(*Pheidole megacephala*)属于膜翅目(Hymenoptera),蚁科(Formicidae),目前人们已经探知的有约11 700种,是一个数量庞大的类群。蚂蚁具有较高的药用价值,具有明显的抗炎、护肝、平喘、镇痛等功效,并具有一定的抗癌作用^[8]。蚂蚁还具有适世代周期短,适应能力和繁殖能力强等特点,因此研究蚂蚁抗菌肽的分离纯化工艺对开拓蚂蚁抗菌肽资源具有重要意义^[9,10]。野生大黑蚁(*Polyrhachis vicina* Roger)属于蚂蚁的一种,本实验通过对野生大黑蚁抗菌肽的分离纯化工艺、抑菌作用以及耐热性研究,为抗菌肽的相关研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

蚂蚁材料由抚松县老家特产有限公司提供,经自贡白蚁防治科学研究所殷建新研究员鉴定为野生大黑蚁(*Polyrhachis vicina* Roger)。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichiacoli*)、酵母菌(*Saccharomyces*)由四川理工学院微生物实验室提供。

乙醇(分析纯)、柠檬酸、柠檬酸钠(四川西陇化工有限公司);石油醚(成都市科龙化工试剂厂);乙二胺四乙酸二钠(广州市新港化工有限公司);MV3500透析袋(美国Viskase公司);MD10MM透析袋(截留分子量为4 000 D, SCIENTIFIC RESEARCH)。

LB固体培养基、LB液体培养基、PDA固体培养基、PDA液体培养基。

1.2 仪器设备

202-1AB热恒温干燥箱,成都晟杰科技有限公司;小型粉碎机,合肥荣事小家店有限公司;索氏抽提器,上海垒固仪器有限公司;TG-16高速离心机,南京秒尊仪器设备有限公司;RE-1002旋转蒸发仪,郑州科达仪器设备有限公司;LRH-800F生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;DZKW-4电子恒温水浴锅,北京中兴伟业仪器有限公司;日立L-8900

氨基酸分析仪,日本日立公司。

1.3 方 法

1.3.1 粗提物的制备

称取20 g野生大黑蚁,放入托盘中摊平,放入烘箱,于50℃下烘干至质量恒重。用小型粉碎机将其粉碎,过60目筛后得黑蚂蚁粉。将黑蚂蚁粉用滤纸包好,用长镊子放入索氏抽提器中^[11],加入适量石油醚,于80℃恒温水浴中抽提4 h,用滤纸点滴检查无油迹为止。抽提完毕后取出滤纸包,置于通风处至石油醚完全挥发。称取10 g除脂后的黑蚂蚁粉按1:30(m/V)加入60%乙醇,用电动匀浆机匀浆后于4℃下浸提24 h,滤纸过滤,将滤液于4℃,7 000 r/min离心20 min,取上清,得黑蚂蚁粗提液。将粗提液旋转蒸发挥去乙醇,得黑蚂蚁初提液浓缩液。

1.3.2 黑蚂蚁粗提液的纯化

将透析袋剪成20 cm长的小段,放入500 mL 2%(m/V)的碳酸氢钠溶液和1 mmol的EDTA溶液中煮沸10 min。将处理好的MV3500透析袋用蒸馏水冲洗干净,装入适量的黑蚂蚁浓缩液,放入pH为7的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中进行透析,每2 h换一次缓冲液,重复透析5次,透析完成后的透析液装入MD10的透析袋中,然后将其外面套上MV3500的透析袋,一起透析,重复上述步骤,取MV3500和MD10型透析袋之间的截留的黑蚂蚁提取液。

1.3.3 提取液抑菌活性的检测

采用牛津杯法^[12],分别以枯草芽胞杆菌、大肠杆菌和酵母菌为受试菌。将枯草芽胞杆菌和大肠杆菌接种至LB固体培养基,37℃恒温培养箱中培养24 h;酵母菌接种至PDA固体培养基,30℃恒温培养箱中培养24 h,活化2次。将明显的单菌落分别接种于LB液体培养基和PDA液体培养基,分别于37℃(枯草芽胞杆菌和大肠杆菌)和30℃(酵母菌)恒温双层摇床培养48 h。取培养完成的菌液1 mL,加入9 mL无菌生理盐水中,梯度稀释至每毫升 1×10^6 CFU。取3种受试菌200 μL注入到有加热融化后的LB(枯草芽胞杆菌和大肠杆菌)和PDA(酵母菌)培养基的平皿中^[13],混匀,凝结后放上牛津杯,牛津杯内加入100 μL的黑蚂蚁提取液,分别置于37℃(枯草芽胞杆菌和大肠杆菌)和30℃(酵母菌)下恒温培养24 h,观察抑菌效果,测量抑菌圈直径。以75%酒精为阳性对照,实验重复3次,计算平均值。

1.3.4 提取液耐热性检测

① 不同温度加热30 min

100℃恒温水浴锅中加热30 min,对枯草芽胞杆菌进

取相同浓度的黑蚂蚁提取液,分别于60、80和

行抑菌实验,观察抑菌圈直径变化。以未加热的黑蚂蚁提取液为对照,实验重复3次,计算平均值。

② 80 °C下加热不同时间

研究表明,高温条件,对抗菌肽活性有影响^[7,8],取相同浓度的黑蚂蚁提取液,于80 °C恒温水浴锅中分别加热50、70、90 min,对枯草芽胞杆菌进行抑菌实验,观察抑菌圈直径变化。以未加热的黑蚂蚁提取液为对照,实验重复3次,计算平均值。

1.3.5 总氨基酸分析

样品的前处理:取3 mL黑蚂蚁提取液样品于25 mL的水解管中,加入3 mL浓盐酸和4 mL 6 mol/L盐酸,滴入苯酚,并在冷冻条件下用高纯氮充分置换空气后用酒精喷灯封管。将封管后水解管置于恒温箱内,在110 °C条件下恒温水解22 h,冷却至室温后开管并转移至100 mL容量瓶中,定容至100 mL后均匀混合,用移液枪取1 mL于安培瓶中。将安培瓶置于真空干燥箱中,58 °C条件下真空干燥,完全干燥后再加入1 mL纯净水再次真空干燥直至溶液完全挥发。向干燥后的样品中加入pH 2.2的柠檬酸钠缓冲溶液1 mL,充分震荡摇匀后用带过滤头(过滤头膜孔径为0.22 μm)的一次性针管移取至自动进样瓶在氨基酸分析仪中进行分析。

2 结果与分析

2.1 提取液中抗菌肽类物质的抑菌效果

抗菌肽类物质分子量一般为2 000到7 000左

右^[1],对提取物经透析后,可初步确定MV3500和MD10型透析袋之间的截留的黑蚂蚁提取液含有抗菌肽类物质。通过抑菌实验可见,黑蚂蚁提取液对枯草芽胞杆菌(革兰氏阳性菌)有明显的抑菌圈(图1),抑菌圈平均直径为(24.0±0.5) mm(表1),而对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和酵母菌(真菌)均无明显抑菌圈,阳性对照75%酒精抑菌圈直径为(12.0±0.5) mm。黑蚂蚁提取液的抑菌作用,表明本试验方法成功分离出了对革兰氏阳性菌枯草芽胞杆菌有抑菌效果的抗菌肽类物质。

表1 黑蚂蚁抗菌肽类物质的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of antimicrobial peptides from black ants

实验组	抑菌圈直径 /mm		
	枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	酵母菌 <i>S. cerevisiae</i>
1	24	—	—
2	24	—	—
3	25	—	—

注:“—”无抑菌效果

Note: "—"no bacteriostatic effect

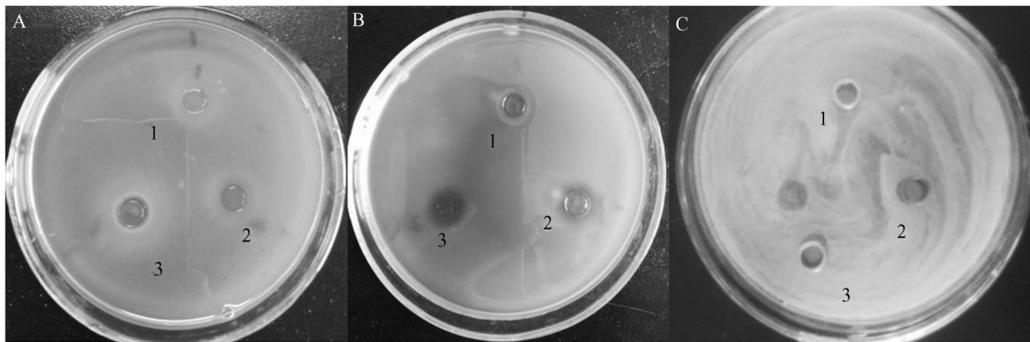


图1 黑蚂蚁抗菌肽类物质提取物对枯草芽胞杆菌(A)、大肠杆菌(B)和酵母菌(C)的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of ant antipeptide on *Bacillus subtilis* (A), *Escherichia coli* (B) and *Saccharomyces* (C)

注:1和2为阳性对照;3. 蚂蚁抗菌肽类物质

Note: 1 and 2 are positive controls; 3. ant antipeptide extract

2.2 黑蚂蚁抗菌肽类物质耐热性

不同温度下加热30 min后对黑蚂蚁抗菌肽类物质抑菌活性无显著差异(图2),说明黑蚂蚁抗菌肽类物质在短时间加热后其抗菌活性没有受到明显影响,表明其有耐热性。由图3可见,在80 °C下分别加热不同时间,与30 min相比,加热50 min后黑蚂蚁

抗菌肽类物质活性显著下降,可见随着加热时间的增加,黑蚂蚁抗菌肽类物质的活性会明显下降。

2.3 黑蚂蚁抗菌肽类物质的氨基酸分析

利用氨基酸分析仪对黑蚂蚁抗菌肽类物质提取液进行分析,结果如图4。由图4和表2可见,黑蚂蚁抗菌肽类物质氨基酸含量较高的种类依次为

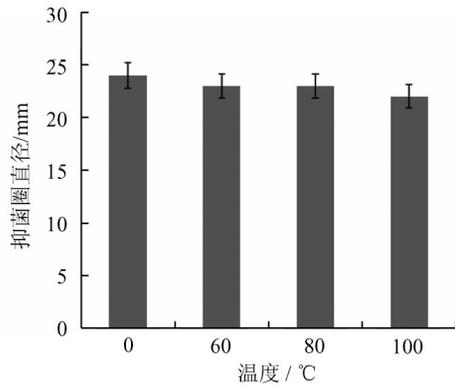


图2 不同温度加热 30 min 对黑蚂蚁抗菌肽类物质抑菌活性的影响

Fig. 2 Heating effects at different temperatures for 30 min on the antibacterial activity of dark ant antibacterial peptides

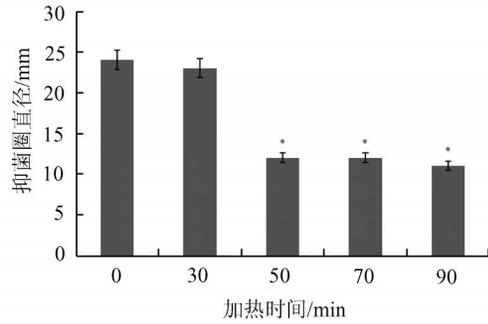


图3 80 °C 下加热不同时间对黑蚂蚁抗菌肽类物质抑菌活性的影响

Fig. 3 Heating effect at 80 °C for different time on anti-bacterial activity of dark ant antibacterial peptide

注: * $P < 0.05$, 与不加热对比较, 有显著差异

Note: * $P < 0.05$, a significant difference compared with the unheated control

表2 黑蚂蚁抗菌肽类物质的氨基酸分析结果

Table 2 Amino acid analysis results of dark ant antibacterial peptide

数目	简称	中文名称	氨基酸浓度 (mg·L ⁻¹)
1	Asp	天冬氨酸	396.0
2	Thr	苏氨酸	199.9
3	Ser	丝氨酸	200.6
4	Glu	谷氨酸	561.2
5	Gly	甘氨酸	281.3
6	Ala	丙氨酸	239.3
7	Cys	半胱氨酸	19.0
8	Val	缬氨酸	221.1
9	Met	甲硫氨酸/蛋氨酸	36.1
10	Ile	异亮氨酸	232.7
11	Leu	亮氨酸	269.2
12	Tyr	酪氨酸	164.6
13	Phe	苯丙氨酸	126.4
14	Lys	赖氨酸	410.6
15	His	组氨酸	141.0
16	Arg	精氨酸	310.7
17	Pro	脯氨酸	324.4

谷氨酸 (Glu) 561.2 mg/L, 赖氨酸 (Lys) 410.6 mg/L, 天冬氨酸 (Asp) 396.0 mg/L, 脯氨酸 (Pro) 324.4 mg/L, 精氨酸 (Arg) 310.7 mg/L, 其它氨基酸含量较低。

3 讨论

滥用抗生素所造成的致病菌的进化加速, 造成了耐药菌的大量出现, 使得抑制变异菌传播的新药

物的研发迫在眉睫。抗菌肽具有广谱抑菌效果^[14], 且不产生耐药性^[15], 有望成为抗生素最佳的替代品, 应用前景广阔。

昆虫由于其机体的免疫功能, 是丰富的抗菌肽资源库^[16], 而国内外从蚂蚁中提取抗菌肽的研究并不多, 并且尚未有对抗菌肽纯化鉴定序列的相关研究。国内苏翔^[8]利用层析法从蚂蚁中分离得到过抗菌肽类物质; 国外有科学家从蚂蚁毒液^[17], 蚂蚁旋毛

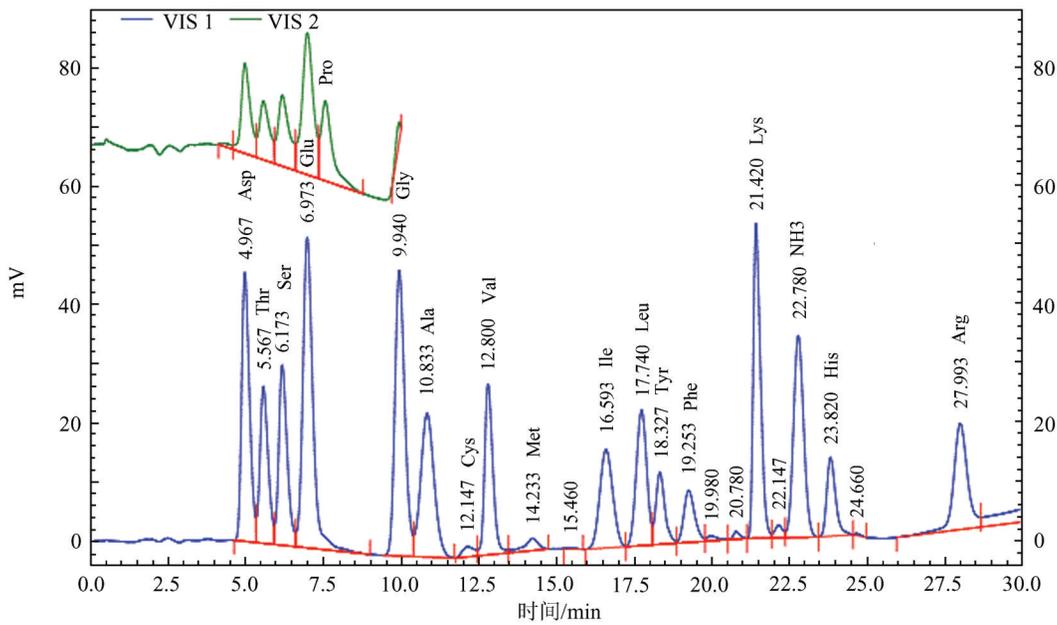


图4 黑蚂蚁抗菌肽类物质的氨基酸分析质谱图

Fig. 4 Mass spectrum of amino acid analysis of dark ant antibacterial peptide

虫^[18]中分离出抗菌肽。总的来说,目前抗菌肽的提取与相关作用机理还在研究阶段,提取工艺繁杂且产量甚微,难以大规模生产,从而限制了抗菌肽的广泛应用。本文采用多层透析提取方法,通过对分子量的限定能够很好地分离抗菌肽类物质,具有方便快捷,成本低的特点;对蚂蚁抗菌肽耐热性的进一步研究,拓展了其实际应用范围,对以后工厂化生产工艺方面提供了有利的材料。虽然本实验筛选的抗菌肽表现出对革兰氏阳性菌的抑菌效果,但是否为单一种类的革兰氏阳性抗菌肽,还是多种革兰氏阳性抗菌肽,在抗菌肽的靶向性问题上还有待进一步研究;另外,虽然通过多层透析方法能够稳定得到分子量在特定区间的抗菌肽类物质,便于节约时间、成本以及推广,然而由于抗菌肽的序列信息还未确定,故其分子量序列信息等理化性质仍有待进一步验证。

参考文献

[1] Yin W, Xu C, Ma G J. Research progress on antimicrobial peptides [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(Suppl): 136-138.
尹文,徐晨,马戈甲. 抗菌肽的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(Suppl): 136-138.
[2] Boman H G. Antibacterial peptides; key components needed in immunity [J]. Cell, 1991, 65(2): 205-207.
[3] Shi Q, Liu F P. Status of expression and transgenic research of antibacterial peptide cloned genes [J]. Progress in Bioengineering, 2000, 20(1): 37-40.

石强,刘飞鹏. 抗菌肽克隆基因的表达和转基因研究现状 [J]. 生物工程进展, 2000, 20(1): 37-40.
[4] Tian J T, Xu W. Development of antimicrobial peptides and their application [J]. Yunnan Medicine, 2017, 38(1): 82-84.
田锦涛,徐蔚. 抗菌肽的发展及其应用简述[J]. 云南医药, 2017, 38(1): 82-84.
[5] Miao J Y, Ke C, Guo H X, et al. Advances in extraction, isolation and antibacterial mechanism of antimicrobial peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 233-240.
苗建银,柯畅,郭浩贤,等. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 233-240.
[6] Yang X C, Yang C L, Yao D W, et al. Research progress of antibacterial peptides at home and abroad [J]. Tianjin Agricultural Science, 2017, 23(5): 35-41.
燕晓翠,杨春蕾,姚大为,等. 抗菌肽的国内外研究进展[J]. 天津农业科学, 2017, 23(5): 35-41.
[7] Lapis K. Physiologic and pathophysiologic significance of antimicrobial (host defensive) small peptides [J]. Orv Hetil, 2008, 149 (51): 2419-2424.
[8] Su X. Isolation and activity of ant antibacterial peptides [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.
苏翔. 蚂蚁抗菌肽的分离纯化及其活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
[9] Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors -taking an evolutionary approach [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(3): 165-178.
[10] Chen X M, Feng Y. Introduction to resource entomolo-

- gy [M]. Beijing: Science Press, 2009: 7.
- 陈晓鸣, 冯颖. 资源昆虫学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 7.
- [11] Wang Y L, Ding S F, Song Y, *et al.* Discussion on the method of measuring crude fat content by Soxhlet extraction [J]. *Grain Processing*, 2014, 39(5): 76-77.
- 王玉玲, 丁淑芬, 宋岩, 等. 索氏抽提法测定粗脂肪含量方法的探讨[J]. *粮食加工*, 2014, 39(5): 76-77.
- [12] Liu D M, Li L, Yang X Q, *et al.* Determination of antibacterial activity of probiotics by Oxford Cup method [J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(3): 110-111.
- 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 110-111.
- [13] Wang Z Y, Jing J, Su T T. Extraction of antibacterial peptides from *Rana chensinensis* and its antibacterial activity [J]. *Food Technology*, 2010, 35(6): 235-238.
- 王战勇, 井静, 苏婷婷. 中国林蛙皮抗菌肽的提取及其抗菌活性的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(6): 235-238.
- [14] Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation [J]. *Protein Pept Lett*, 2005, 12(1): 3-11.
- [15] Yin K L, Wang J R, Sun H B. Progress of antimicrobial peptides research and application [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2015, 38(5): 181-185.
- 尹昆仑, 王嘉榕, 孙红宾. 抗菌肽的研究进展及应用前景[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 38(5): 181-185.
- [16] Otvos L Jr. Antibacterial peptides isolated from insects [J]. *Journal of Peptide Science*, 2000, 6 (10): 497-511.
- [17] Aili S R, Touchard A, Escoubas P, *et al.* Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms [J]. *Toxicon*, 2014, 92, 166-178.
- [18] Bhagavathula N, Meedidoddi V, Bourque S, *et al.* Characterization of two novel antimicrobial peptides from the cuticular extracts of the ant *Trichomyrmex criniceps* (Mayr), (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2017, 94(4), e21381.

□