



不同检测方法在抗菌肽抑菌效果评价的比较研究

潘晓倩, 成晓瑜*, 张顺亮, 乔晓玲, 陈文华

(中国肉类食品综合研究中心, 肉类加工技术北京市重点实验室, 北京 100068)

摘要: 目的: 比较5种抗菌肽活性测定方法。方法: 以金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌和枯草芽孢杆菌为实验菌株, 研究牛津杯法、打孔法、滤纸片法、酶标比浊法和活菌计数法对不同质量浓度的抗菌肽抑菌活性评价的比较。结果: 3种琼脂扩散定性抑菌实验中, 打孔法灵敏度高, 抑菌圈清晰规则, 效果最好; 2种定量抑菌实验中, 活菌计数法结果判定更直观, 灵敏度高, 效果最好。结论: 抗菌肽抑菌活性研究过程中, 选用打孔法定性与活菌计数法定量相结合的方法, 能够更全面、准确地反应其抑菌活性。

关键词: 抗菌肽; 抑菌活性; 测定方法

Comparison of Activity Assays for Antimicrobial Peptides

PAN Xiaoqian, CHENG Xiaoyu*, ZHANG Shunliang, QIAO Xiaoling, CHEN Wenhua

(Beijing Key Laboratory of Meat Processing Technology, China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

Abstract: Objective: To comparatively evaluate the performance of several antimicrobial peptide activity assays. Methods: Using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacillus subtilis* as experimental strains, the antimicrobial activity of the antimicrobial peptide nisin at different concentrations was determined by Oxford cup method, punching method, filter paper method, microtiter plate assay and viable count method, respectively. Results: Among three agar-diffusion methods, punching method was the most sensitive, which provided clear and regular inhibition rings. Our comparison of two quantitative activity assays indicated that viable count method, showing high sensitivity and intuitive results, was better than microtiter plate assay. Conclusion: Combined application of punching method and viable count method allows comprehensive and accurate measurement of antimicrobial peptide activity.

Key words: antimicrobial peptide; antimicrobial activity; assay

中图分类号: TS251

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2014) 12-0017-04

抗菌肽是生物体在抵御病原微生物的防御反应过程中产生的一类具有抗菌作用的小分子多肽, 其特有的氨基酸组成与结构可以破坏细菌细胞膜结构, 导致其死亡^[1-2]。抗菌肽不仅具广谱抗菌活性, 对多种肿瘤细胞和癌实体瘤的生长均有明显抑杀作用, 且安全无毒、具有保健作用, 是食品防腐保鲜剂研究开发的一个新的方向^[3-5]。因此, 抗菌肽具有十分广阔的应用前景, 但没有统一的活力计算标准。测定抗菌肽活性的方法有很多种, 其中定性方法主要是琼脂扩散法、包括滤纸片法、平板打孔法和牛津杯法, 三者都是通过抑菌圈的大小来直观反映其抑菌活性; 定量方法主要是酶标比浊法和活菌计数法。

乳酸链球菌素(Nisin)是抗菌肽的典型代表, 是已知的具有抗菌作用的一类活性多肽, 有研究表明, Nisin

能抑制大部分革兰氏阳性菌(G^+ 菌)及其芽孢的生长繁殖, 但对革兰氏阴性菌(G^- 菌)、酵母菌和霉菌没有明显作用^[6-8]。因此, 本实验选取肉制品中常见的3种革兰氏阳性腐败菌: 金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌和枯草芽孢杆菌为实验菌, 研究多种抑菌率测定方法在评价不同质量浓度Nisin抑菌效果时的优缺点, 旨在为抗菌肽筛选及抑菌作用的评价提供方法学参考。

1 材料与方法

1.1 菌种、材料与试剂

金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌和枯草芽孢杆菌中国肉类食品综合研究中心检测中心实验室保藏。

乳酸链球菌素(Nisin) 青岛瑞诺食品配料有限公司;

收稿日期: 2014-08-17

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B09); 北京市优秀人才培养资助项目(2013D001055000002)

作者简介: 潘晓倩(1987—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为微生物与副产物综合利用。E-mail: go_ahead123@163.com

*通信作者: 成晓瑜(1972—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为畜禽骨综合利用及食品风味。E-mail: chxyey@yahoo.com.cn

盐酸、乙醇、NaCl(分析纯) 北京化学试剂厂; 平板计数琼脂、营养肉汤 北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

Synergy H4型酶标仪 美国伯腾仪器有限公司; PB-10型数显酸度计 赛多利斯科学仪器有限公司; SL502N型电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司; 生物安全柜 新加坡Esco公司; F1-45型恒温培养箱、G154DWS湿热灭菌锅 日本三洋公司。

1.3 方法

1.3.1 菌液的制备

无菌条件下, 将甘油保藏的菌种连续活化2次。取活化后的新鲜菌液离心弃去营养肉汤, 再用无菌营养肉汤将其稀释至 10^4 CFU/mL备用。

1.3.2 不同质量浓度Nisin溶液配制

根据GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》^[9]中对于Nisin使用限量要求, 用无菌水配制不同质量浓度的Nisin溶液, 其质量浓度范围为0.00~0.50 g/L。

1.3.3 琼脂扩散法

1.3.3.1 牛津杯法

牛津杯法又称为管碟法, 是国内外测定抗生素效价的通用方法。具体方法为细菌平板计数琼脂 121°C 、15 min高压灭菌后倒板, 每皿15 mL(下层), 凝固后, 再将一定浓度的菌悬液与上述培养基(冷却至 45°C)混合均匀, 加5 mL到已经凝固的培养基上(上层)。以无菌操作在培养基表面垂直放上牛津杯(内径6 mm、外径8 mm、高10 mm的圆形小管), 保证其与培养基之间无空隙, 再在杯中加入一定质量浓度的Nisin溶液100 μL , 以生理盐水作为对照。每组3个平板, 37°C 培养24 h后观察其抑菌圈大小, 取平均值。

1.3.3.2 打孔法

参照曾维才等^[10]的方法, 略作修改。先将灭菌的外径为8 mm的牛津杯放置在平板中央位置, 将一定浓度的菌悬液与灭菌后培养基(冷却至 45°C)混合均匀后倒板, 均匀倒在牛津杯周围, 每皿15~20 mL。凝固后, 用镊子将牛津杯夹出, 则形成直径8 mm的孔洞, 孔内注入不同质量浓度Nisin溶液100 μL , 以生理盐水作为对照。每组3个平板, 37°C 培养24 h后观察其抑菌圈大小, 取平均值。

1.3.3.3 滤纸片法

滤纸折叠为8层后用打孔器制成直径6 mm的圆形滤纸片, 121°C 高温灭菌后干燥备用。灭菌后培养基制成不含菌的平板, 待平板凝固后吸取200 μL 菌液均匀涂布于培养基表面。将准备好的滤纸片置于平板中央, 吸取不同质量浓度Nisin溶液100 μL , 缓慢滴加于滤纸片上, 以生理盐水作为对照。每组3个平板, 37°C 培养24 h后观察其抑菌圈大小, 取平均值。

1.3.4 酶标比浊法

取活化后菌液浓度为 10^4 CFU/mL金黄色葡萄球菌菌液, 接种于营养肉汤中得到3.0 lg(CFU/g)菌液, 分别加入不同质量浓度的Nisin溶液, 使其质量浓度范围为0.00~0.50 g/L, 在 30°C 培养48 h后测定菌液 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$, 每组做3个平行; 以添加生理盐水作为对照组。按照式(1)计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}/\% = \frac{\text{OD}_{600\text{ nm}}\text{对照组} - \text{OD}_{600\text{ nm}}\text{实验组}}{\text{OD}_{600\text{ nm}}\text{对照组}} \quad (1)$$

1.3.5 活菌计数法

参照马卫明^[11]的方法, 略作修改。分别吸取 10^4 CFU/mL的细菌培养物500 μL 到无菌的Eppendorf管中, 一管为实验管, 一管为对照管。实验管中分别加入不同质量浓度的Nisin 500 μL , 总体积为1 mL, 使其质量浓度为0.00~0.50 g/L; 对照管中加入等体积的无菌生理盐水, 每个质量浓度做3个平行。各管混匀后, 放在 37°C 条件下振荡孵育1 h后分别作 10^1 、 10^2 、 10^3 倍稀释, 每个稀释度分别取100 μL 涂布于平板计数琼脂上, 37°C 培养24 h后观察并记录每板上的菌落数量。根据稀释度和涂布接种量计算出每管原液中的细菌数量, 按照式(2)计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}/\% = \frac{\text{对照管细菌数量} - \text{实验管细菌数量}}{\text{对照管细菌数量}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 3种琼脂扩散法对Nisin抑菌效果的评价

表1 3种琼脂扩散法测定不同质量浓度Nisin溶液的抑菌效果
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Mean diameter of inhibition zone of different concentrations of nisin by three methods ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Nisin质量 浓度/ (g/L)	平均抑菌圈直径/mm								
	牛津杯法			打孔法			滤纸片法		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.15	—	—	—	8.20 $\pm$ 0.42	—	8.50 $\pm$ 0.18	—	—	—
0.20	—	—	—	9.20 $\pm$ 0.25	8.65 $\pm$ 0.35	9.65 $\pm$ 0.20	6.80 $\pm$ 0.64	6.50 $\pm$ 0.34	6.95 $\pm$ 0.38
0.25	8.68 $\pm$ 0.43	8.35 $\pm$ 0.20	8.75 $\pm$ 0.26	10.05 $\pm$ 0.73	9.65 $\pm$ 0.61	10.85 $\pm$ 0.00	7.00 $\pm$ 0.32	6.85 $\pm$ 0.22	7.20 $\pm$ 0.50
0.30	9.12 $\pm$ 0.25	9.05 $\pm$ 0.42	9.50 $\pm$ 0.36	11.10 $\pm$ 0.40	10.55 $\pm$ 0.22	11.55 $\pm$ 0.42	8.05 $\pm$ 0.13	7.95 $\pm$ 0.14	8.20 $\pm$ 0.16
0.35	9.85 $\pm$ 0.87	9.85 $\pm$ 0.87	9.90 $\pm$ 0.17	11.85 $\pm$ 0.32	11.36 $\pm$ 0.44	12.10 $\pm$ 0.40	9.10 $\pm$ 0.68	9.00 $\pm$ 0.38	9.15 $\pm$ 0.48
0.40	10.26 $\pm$ 0.14	10.00 $\pm$ 0.38	10.55 $\pm$ 0.35	12.00 $\pm$ 0.51	11.90 $\pm$ 0.30	12.55 $\pm$ 0.10	9.82 $\pm$ 0.47	9.52 $\pm$ 0.59	9.85 $\pm$ 0.65
0.45	10.80 $\pm$ 0.17	10.45 $\pm$ 0.14	11.00 $\pm$ 0.20	12.30 $\pm$ 0.34	12.15 $\pm$ 0.45	12.80 $\pm$ 0.42	10.05 $\pm$ 0.24	9.85 $\pm$ 0.44	10.25 $\pm$ 0.47
0.50	11.20 $\pm$ 0.29	11.05 $\pm$ 0.21	11.35 $\pm$ 0.75	12.60 $\pm$ 0.62	12.45 $\pm$ 0.33	13.00 $\pm$ 0.43	10.62 $\pm$ 0.42	10.40 $\pm$ 0.20	10.85 $\pm$ 0.33

注: 一. 无抑菌圈; A. 金黄色葡萄球菌; B. 溶血性葡萄球菌; C. 枯草芽孢杆菌。

在琼脂扩散法中, 一方面添加的菌种在适宜的条件下开始生长繁殖; 另一方面, 抗菌肽Nisin呈球面扩散,

即随着离中心加液位置距离的增加, Nisin质量浓度逐渐变小, 在最低抑菌质量浓度处有一条带, 在这条带的范围内菌不能生长而成透明的圆圈, 即抑菌圈^[12-13]。针对同一种抑菌物质, 其质量浓度越大, 抑菌圈也越大。本实验比较了3种琼脂扩散法测定不同质量浓度的Nisin对3种腐败菌抑制作用时的抑菌圈大小, 结果如表1所示。3种方法均能检测到Nisin对3种腐败菌具有一定抑制作用, 其强弱顺序的结果一致, 均为枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>溶血性葡萄球菌, 且Nisin质量浓度越大, 抑菌作用越强。但3种方法测定抑制效果时的灵敏度不一致, 打孔法的灵敏度最高, 当Nisin质量浓度为0.15 g/L时就可观察到对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈; 其次为滤纸片法, 0.20 g/L Nisin即可表现出抑菌效果; 最后是牛津杯法, 当Nisin质量浓度为0.25 g/L时, 才能观察到抑菌圈。琼脂扩散法中Nisin的抗菌作用则受到其在培养基中扩散情况的影响, 且一定质量浓度的Nisin在培养基中扩散后, 质量浓度变小, 不易控制, 因此一般情况下只用于定性分析。

从抑菌圈的清晰程度和形状来看, 打孔法效果最佳, 这可能是因为抗菌肽在孔洞中与琼脂接触面积大, 能够更充分均匀地扩散到培养基中, 与目标菌相互作用, 所得的抑菌圈既规则又清晰。而牛津杯法在放置牛津杯时力度难以掌握, 可能造成牛津杯在培养基表面滑动或抗菌肽渗透扩散的不均匀。滤纸片法所得的抑菌圈形状较规则, 但由于含药滤纸层全部暴露在空间中, 抗菌肽可能会有少部分结晶析出, 造成灵敏度偏低。这与刘春云等^[14]的研究结果相似, 但与张慧等^[15]之前的结论有所冲突, 这可能是因为本实验中所用的打孔法经过修改, 避免了火焰封板相关的缺点。

2.2 酶标比浊法对Nisin抑菌效果的评价

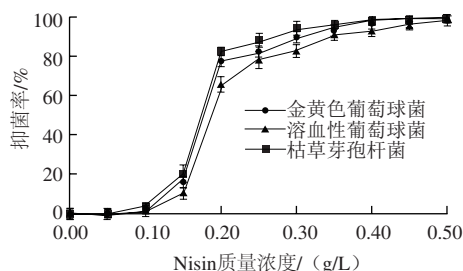


图1 酶标比浊法测定Nisin对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of nisin on *Staphylococcus aureus* by microtiter plate assay

由图1可知, 当Nisin质量浓度小于0.10 g/L时, 对3种腐败菌没有起到明显的抑制作用; 在0.10~0.20 g/L范围内, 抑菌率随Nisin质量浓度的增加而显著提高; 此后抑菌率随Nisin质量浓度的增加而缓慢提高。在Nisin质量浓度为0.15 g/L时, 对3种菌均已表现出一定的抑菌作

用, 可见, 用酶标比浊法测出的药物抗菌效力比用琼脂扩散法要大些, 这可能与抗菌肽在琼脂中的渗透性有关^[16], 即抗菌肽在琼脂中的渗透作用有限, 而在液体状态下抗菌肽能与目标菌作用更充分。

酶标比浊法是基于菌悬液浊度与其OD值具有一定相关性的原理而设计的, 该方法与传统分光光度计测定菌悬液OD值相比具有快速准确和高通量的优点。不仅能减少因菌悬液的沉降而造成的随机误差, 且酶标板上有96个小孔可在短时间内测定多个样品^[17]。但该方法也具有一定的局限性, 如菌液缓冲体系的不均一、不稳定, 终止时间的控制等细微变化均会影响测定结果, 致使结果的重现性较差^[18-19]。

2.3 活菌计数法对Nisin抑菌效果的评价

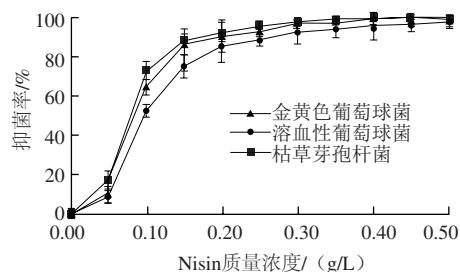


图2 活菌计数法测定Nisin对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Fig.2 Inhibitory effect of nisin on *Staphylococcus aureus* by viable count method

由图2可知, Nisin质量浓度在0.00~0.15 g/L的质量浓度范围内增加时, 对3种腐败菌的抑菌率显著提高, 对金黄色葡萄球菌的抑菌率由0.00%提高至86.55%; 对溶血性葡萄球菌的抑菌率由0.00%提高至75.21%; 对枯草芽孢杆菌的抑菌率由0.00%提高至88.31%。此后抑菌率随Nisin质量浓度的增加而缓慢提高。可见, 与酶标比浊法相比, 活菌计数法测定抗菌肽抑菌活性时的灵敏度更高, 在较低质量浓度时已经表现出一定抑菌作用。这可能是因为此方法检测过程中, Nisin会与目标菌在未添加培养基的情况下相互作用一段时间, 有相关研究^[20]表明, 抗菌物质与目标菌相互作用时间越长, 抑菌率越大。

3 结论

实验选用的金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均为G⁺菌, 且为肉制品中常见的腐败菌, 对研究多种抑菌率测定方法在评价Nisin的抑菌作用时具有一定的代表意义。根据实验结果判定, 3种琼脂扩散定性抑菌实验中, 打孔法灵敏度高, 抑菌圈清晰, 规则, 效果最好, 与牛津杯法和滤纸片法渗透扩散途径相比具有一定的优越性, 是抗菌肽定性分析较理想的方法。2种定量抑菌实验中, Nisin与目标菌株在液体状态下充分混

合, Nisin的质量浓度容易控制。其中活菌计数法的敏感性更高, 结果判定更直观, 效果最好。因此, 在抗菌肽抑菌作用评价过程中, 采用打孔法定性与活菌计数法定量相结合的方法, 能够更全面、准确地反应其抑菌活性。

参考文献:

- [1] 田彩平. 抗菌肽的分布及抗肿瘤作用[J]. 甘肃医药, 2011, 30(12): 722-724.
- [2] BROGDEN K. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 238-250.
- [3] 张顺亮, 潘晓倩, 成晓瑜, 等. 牛骨胶原蛋白源抑菌肽的分离纯化及成分分析[J]. 肉类研究, 2013, 27(11): 33-36.
- [4] 赵红艳, 慕玉. 抗菌肽在食品防腐剂中的应用[J]. 卫生研究, 2009, 48(4): 502-504.
- [5] ANDREU D, RIVAS L. Animal antimicrobial peptides: an overview[J]. Biopolymers, 1998, 47: 415-433.
- [6] HARRIS L J, FLEMING H P, KLAENHAMMER T R. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain isolated from a commercial sauerkraut fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 58: 1477-1483.
- [7] 张百刚, 高华. Nisin抑菌作用的研究[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(10): 26-28.
- [8] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(9): 87-91.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [10] 曾维才, 谭敏, 张佳琪, 等. 不同抑菌方法在食品防腐剂效果评价方面的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2010, 27(3): 112-117.
- [11] 马卫明. 猪小肠抗菌肽分离鉴定及其生物活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [12] 刘益丽, 邓霄禹, 江明锋. 溶菌酶抑菌活性及检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(8): 189-194.
- [13] YU L P, SUN B G, LI J, et al. Characterization of a C-type lysozyme of *scophthalmus maximus*: expression, activity, and antibacterial effect[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 46-54.
- [14] 刘春云, 武廷章, 周大喜, 等. 凤丹丹皮酚抗菌作用的研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 23-24.
- [15] 张慧, 秦志华, 邹明, 等. 抗禽大肠杆菌中药的体外抑菌方法和效果的研究[J]. 浙江农业学报, 2014(3): 598-602.
- [16] 马建凤, 刘华钢, 朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 42-45.
- [17] 陈默, 王志伟, 胡长鹰, 等. 酶标仪法快速评价香兰素的抑菌活性[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 63-66.
- [18] 董卫星, 刘淑鑫, 钟丹, 等. 溶菌酶测定方法的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(1): 58-61.
- [19] 洪潇, 余若黔. 溶菌酶的活性测定方法[J]. 生物技术通报, 2004(5): 40-43.
- [20] 解学魁, 陈丽华, 付亚书, 等. 抗菌制品的抑菌效果检测方法研究[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(7): 634-635.