

日本鳎脾脏小分子抗菌肽的分离纯化

梁 英^{1,2}, 关瑞章^{1,2*}, 黄文树^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学鳎鲷现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 为分离日本鳎脾脏中的抗菌肽, 实验采用 10 ku 和 3 ku 切向流中空纤维柱对脾脏醋酸粗提物进行分级分离, 并结合阳离子交换层析和反相高效液相层析技术对小于 10 ku 和小于 3 ku 2 部分样品分别进行分离纯化。结果显示, 2 种分子量截留纤维柱超滤获得了大于 10 ku、小于 10 ku 和小于 3 ku 3 部分样品。小于 10 ku 和小于 3 ku 蛋白样品抗菌活性较大于 10 ku 样品强。对小于 10 ku 样品经阳离子交换层析以及采用 pH 9 缓冲液进行反相高效液相层析分离纯化, 获得一个抗菌肽, 质谱分析其分子量为 1 391.82 u; 对小于 3 ku 样品经阳离子交换层析并采用 pH 9 和 pH 2 两种缓冲液进行反相高效液相层析分离纯化, 获得一个抗菌肽, 质谱分析其分子量为 839.19 u。研究表明, 日本鳎脾脏中起抗菌活性的主要成分是一些小分子蛋白。

关键词: 日本鳎; 脾脏; 抗菌肽; 分离纯化

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

中国是世界上最大的鳎鲷生产国, 鳎鲷也是中国单品种出口创汇最高的农产品之一^[1]。目前高密度集约化养殖条件下, 细菌性疾病的爆发是影响鳎鲷养殖最重要的因素之一。生产过程中如频繁使用抗生素等化学药物可导致耐药菌株的出现, 同时化学药物在食物链中的残留^[2], 也严重威胁着人类的健康。由于鳎鲷病原菌的众多血清型导致应用于鳎鲷养殖的疫苗非常有限^[3]。所以, 开发新型抗菌药物已成为鳎鲷等水产养殖产业中的重要课题。抗菌肽也称宿主防御肽, 作为生物体非特异性免疫系统的一个重要组成部分, 广泛分布于动植物、昆虫和细菌等多种生物体内, 可抑制或杀死细菌、真菌、寄生虫和病毒。由于其特殊的作用机理^[4], 细菌不易对其产生耐药性, 因而有望成为一种新型的生物药物替代传统的抗生素。

鳎鲷同其他鱼类一样是一类低等脊椎动物, 其特异性免疫系统还不够完善, 非特异性免疫系统却较为发达, 当其受到损伤或病原微生物侵袭时, 能迅速产生相关免疫分子来防御病原微生物

的入侵, 在过去几十年里, 从鳎鲷中发现的体液免疫因子包括蛋白酶^[5]、溶菌酶^[6]、凝集素^[7]、抗菌肽。对鳎鲷抗菌肽的研究主要集中于表皮黏液, Ebran 等^[8]使用离子去污剂从欧洲鳎鲷表皮黏液中提取到分子量为 43 ~ 67 ku 的一系列疏水蛋白, 对嗜水气单胞菌有抑制作用; Ebran 等^[9]使用离子去污剂和超滤的方法从欧洲鳎鲷的表皮黏液中分离到一个疏水性蛋白, 分子量为 45 ku, 对金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌有抑制作用。此外, 张东玲等^[10]从日本鳎鲷的肝脏中分离并鉴定了一个血红蛋白源性抗菌肽, 对迟钝爱德华菌有较强抗菌活性。脾脏作为次级淋巴器官可能包含大量的抗菌肽, 如 PR-39 即是一个从哺乳动物(猪)脾脏中分离到的含有 39 个氨基酸残基, 分子量为 4 719.7 u 的小肽^[11]。根据现有的资料, 尚未见到从日本鳎鲷脾脏中分离到抗菌肽的报道。

本实验以鳎鲷脾脏为材料, 采用切向流超滤、离子交换层析和反相高效液相层析(RP-HPLC)技术从中分离抗菌肽, 研究鳎鲷抗菌肽的特性和

收稿日期: 2013-01-06 修回日期: 2013-03-16

资助项目: 国家农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-043); 集美大学科研基金(ZQ2012010); 集美大学鳎鲷现代产业技术教育部工程研究中心开放基金(ZK2013002); 集美大学李尚大学科建设基金

通信作者: 关瑞章, E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

作用机制,为开发新的生物防治药物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

日本鳎,体质量约 300 g,外观无明显病变和损伤,来自集美大学海水养殖试验场。

迟钝爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*, 编号 B09)、气单胞菌属 (*Aeromonas* sp., 编号 B18)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, 编号 B27) 均为从病鳎分离到的致病菌,由本实验室菌种库提供,编号为本库编号。

1.2 主要试剂

CM-纤维素购自 Amersham 公司,中低分子量标准蛋白购自美国 Fermentas 公司,肽分子量标准购自 Amersham 公司,冰醋酸、醋酸铵、乙酸钠为上海化学试剂公司产品,Tris 和三氟乙酸 (TFA) 为分析纯,乙腈 (ACN) 为色谱纯。

1.3 脾脏抗菌肽的纯化

粗提液制备 剖取鳎脾脏,加入 10 倍体积的 10% 醋酸,组织匀浆机搅拌后,用磁力搅拌器在 4 ℃ 搅拌过夜,沸水浴 10 min,迅速置冰上保存,8 000 × g,4 ℃ 离心 60 min,取上清液冻干。冻干样品用 Milli-Q 水溶解后,一部分用 10 ku 纤维柱超滤分离,一部分用 3 ku 纤维柱超滤分离,将样品分为分子量 (Mw) 大于 10 ku、小于 10 ku 和小于 3 ku 3 部分,分别冷冻干燥。

阳离子交换层析 小于 10 ku 样品和小于 3 ku 样品分别溶于 Milli-Q 水中,0.22 μm 滤膜过滤,采用 CM_Sephacrose_FF_16/20 自装柱 (柱体积 40 mL) 进行离子交换层析分离,小于 10 ku 样品分离程序:以 0.1 mol/L 乙酸钠 (pH 4) 缓冲液平衡 200 mL,未结合的样品以 0.1 mol/L 乙酸钠洗脱 200 mL,结合的样品用 4 mol/L 乙酸钠 (NH₄AC) 缓冲液以 0 ~ 1.6 mol/L 梯度洗脱 200 mL,再以 1.6 ~ 4.0 mol/L 梯度洗脱 100 mL,流速为 10 mL/min。小于 3 ku 样品分离程序:以 0.1 mol/L 乙酸钠 (pH 4) 缓冲液平衡 160 mL,未结合的样品以 0.1 mol/L 乙酸钠洗脱 40 mL,结合的样品用 4 mol/L 乙酸钠缓冲液以 0 ~ 0.96 mol/L 梯度洗脱 20 mL 后,以 0.96 ~ 2.0 mol/L 梯度洗脱 80 mL,再以 2.0 ~ 4.0 mol/L 梯度洗脱 20 mL,流速为 8 mL/min。检测吸光值 A₂₈₀,收集主要洗脱峰。

反相高效液相色谱层析 小于 10 ku 样品

阳离子交换层析主要洗脱峰用反相预装柱 Source 5_RPC_ST_4.6/150 (柱体积 2.5 mL) 按以下程序进行分离:A1 液 (0.01 mol/L Tris-Cl/2% ACN, pH 9) 平衡 7.5 mL,上样 2 mL,A1 液洗脱 5 mL,B 液 (70% ACN) 从 0% ~ 25% 线性洗脱 5 mL,25% ~ 100% 线性洗脱 15 mL,按峰收集各洗脱组分,每管 0.1 mL,流速为 1 mL/min,冻干后备用。对活性较好的洗脱峰用反相预装柱 Cosmosil-5C₁₈-MS-II, 4.6/250 (柱体积 4 mL) 按以下程序进一步分离:A1 液平衡 8 mL,上样 0.2 mL,A1 液洗脱 4 mL,B 液 (70% ACN) 从 0% ~ 62% 线性洗脱 20 mL,62% ~ 100% 线性洗脱 4 mL,按峰收集各洗脱组分,每管 0.1 mL,流速为 0.5 mL/min,冻干后检测抗菌活性。小于 3 ku 样品阳离子交换层析主要洗脱峰用反相预装柱 Cosmoil-5C₁₈-AR,10/250 (柱体积为 20 mL) 按以下程序进行分离:A1 液平衡 40 mL,上样 2 mL,A1 洗脱 30 mL,B 液 (70% ACN) 从 0% ~ 100% 线性洗脱 100 mL,按峰收集各洗脱组分,每管 0.5 mL,流速为 2 mL/min,冻干后备用。对活性较好的组分用反相预装柱 5C₁₈-MS-II, 4.6/250 (柱体积 4 mL) 进一步分离纯化:A2 液 (0.1% TFA/2% ACN, pH 2) 平衡 8 mL,上样 0.5 mL,A2 液洗脱 4 mL,B 液 (70% ACN) 从 0% ~ 48% 线性洗脱 16 mL,48% ~ 100% 线性洗脱 4 mL,按峰收集各洗脱组分,每管 0.14 mL,流速为 0.8 mL/min,冻干后检测抗菌活性。

1.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度的测定采用 Bradford^[12] 方法,用牛血清白蛋白作为标准。

1.5 抗菌活性检测

采用琼脂板孔穴扩散法检测相同蛋白含量下脾脏大于 10 ku、小于 10 ku 和小于 3 ku 样品对 10⁵ cfu/mL B09、B18 和 B27 的抗菌活性。测量抑菌圈半径。

采用微量液体培养法检测小于 10 ku 和小于 3 ku 样品反相高效液相层析洗脱峰对 10⁴ cfu/mL B09、B18 和 B27 的抗菌活性。参照陆婕等^[13] 方法略加修改。实验组:取 3 μL 抗菌肽样品和 3 μL 菌液混合;对照组:取 3 μL 0.85% 生理盐水和 3 μL 菌液混合,28 ℃ 孵育 1 h,分别取实验组和对照组的混合液 4 μL 点样于普通培养基上,28 ℃ 培养 24 h,分别计算实验组和对照组在培养基上生长的菌落数 *N*,按下列公式计算杀伤指数,杀伤指数 *K*,

(%) = [1 - N(实验组)/N(对照组)] × 100%。

1.6 分子量及纯度测定

对大于 10 ku 样品、小于 10 ku 样品和小于 3 ku 样品采用 2 层凝胶的不连续体系 Tricine-SDS-PAGE 电泳,胶浓度为 16%,测定蛋白成分及其分子量。

纯化的抗菌肽纯度采用基质辅助激光解吸/离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行检测,质谱分析由厦门大学生命科学学院进行,质谱仪为 REFLEX III 质谱仪(BRUKER, Germany)。

2 结果

2.1 脾脏大于 10 ku、小于 10 ku 和小于 3 ku 样品抗菌活性及电泳结果

在相同蛋白含量条件下,脾脏小于 10 ku 样品和小于 3 ku 样品抑菌活性比大于 10 ku 样品强。小于 10 ku 样品对 10^5 cfu/mL B09、B18 和 B27 的抑菌圈半径分别为 3 mm、4 mm 和 10 mm;小于 3 ku 样品对 B09、B18 和 B27 的抑菌半径分别为 4 mm、4 mm 和 15 mm,大于 10 ku 样品对 B09 和 B18 的抑菌半径分别为 3 mm、1 mm,对 B27 无抑菌活性。电泳结果显示,大于 10 ku 样品成分较复杂,样品经过 10 ku 和 3 ku 切向流纤维柱超滤后蛋白成分大小基本在 10 ku 以下(图 1)。

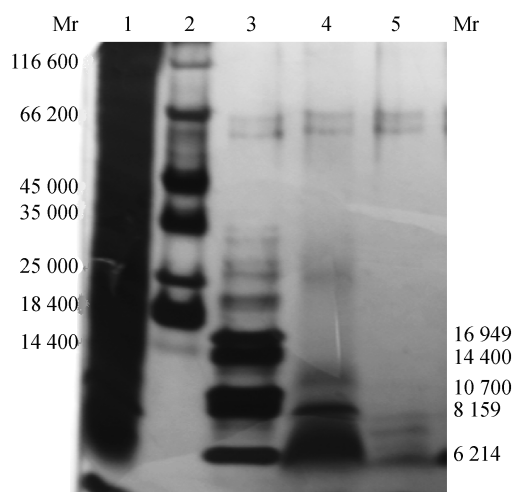


图 1 Tricine 电泳分析小于 10 ku、小于 3 ku 和大于 10 ku 样品

1. 大于 10 ku 样品; 2. 低分子量标准品; 3. 肽分子量标准品; 4. 小于 10 ku 样品; 5. 小于 3 ku 样品。

Fig. 1 Tricine SDS-PAGE analysis of the protein samples of Mw < 10 ku, Mw < 3 ku and Mw > 10 ku Lane 1. the protein sample of Mw > 10 ku, Lane 2. low molecular weight markers, Lane 3. peptide markers, Lane 4. the protein sample of Mw < 10 ku, Lane 5. the protein sample of Mw < 3 ku.

2.2 脾脏抗菌肽的纯化

小于 10 ku 样品分离纯化 小于 10 ku 样品经阳离子交换层析在 420 ~ 460 mL 处出现主要洗脱峰(图 2),该洗脱峰经 Source 5_RPC_ST_4.6/150 反相预装柱层析后在洗脱体积 14 ~ 20 mL 之间收集到 7 个主要组分 F1 ~ F7(图 3),对活性较好的 F3 组分进一步使用反相柱 Cosmosil-5C₁₈ MS-II,4.6/250 分离,获得的两个组分 F3-1 和 F3-2(图 4),F3-1 对 10^4 cfu/mL B09、B18 和 B27 杀伤指数分别为 49%、0% 和 40%(图 5),F3-2 无抑菌活性。

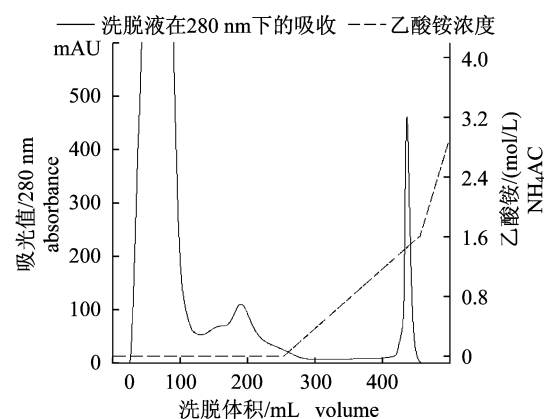


图 2 小于 10 ku 样品阳离子交换层析图谱
主要洗脱组分位于 420 ~ 460 mL,收集该组分。

Fig. 2 Elution profile of the protein sample of Mw < 10 ku by the cationic exchange liquid chromatography

The main fraction distributed at 420 mL to 460 mL was collected.

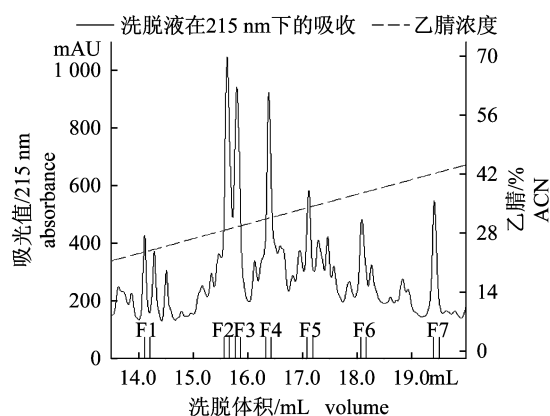


图 3 小于 10 ku 样品阳离子交换洗脱峰经反相高效液相层析分离图谱

在洗脱体积 14 ~ 20 mL 之间收集到 7 个主要洗脱峰(F1-F7)。

Fig. 3 Elution profile of the fractions obtained from the cationic exchange liquid chromatography of the protein sample with the Mw < 10 ku by RP-HPLC

The main fractions of F1 to F7 distributed at 14 mL to 20 mL were obtained.

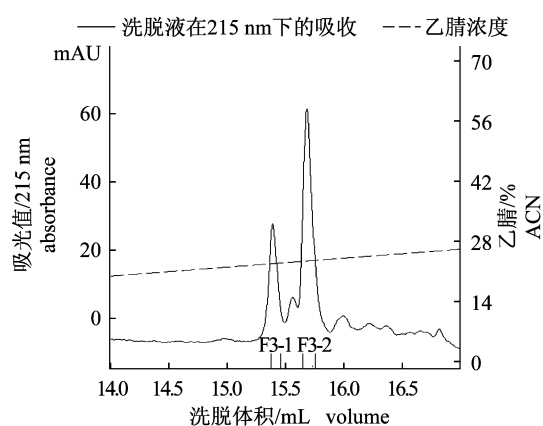


图 4 F3 组分反相高效液相层析分离图谱
获得两个主要洗脱峰 F3-1 和 F3-2。

Fig. 4 Elution profile of the fraction F3
by RP-HPLC

The two fractions of F3-1 and F3-2 were collected.



图 5 F3-1 组分对 10^4 cfu/mL B09、
B18 和 B27 的抗菌作用

D. 菌液 + F3-1 样品; D'. 菌液 + 0.85% 生理盐水。

Fig. 5 Antibacterial activities of the fraction F3-1
against 10^4 cfu/mL B09, B18 and B27

D. indicated bacteria mixed with the fraction F3-1; D'. indicated
bacteria mixed with the 0.85% saline.

小于 3 ku 样品分离纯化 小于 3 ku 样品
经阳离子交换层析在 100 ~ 120 mL 处出现主要
洗脱峰(图 6),该洗脱峰经反相预装柱 Cosmoil-
5C₁₈-AR,10/250 分离,在洗脱体积为 55 ~ 90 mL
收集到 14 个主要组分 F1 ~ F14(图 7),选择抗菌
活性较强的 F7 组分继续用反相预装柱 Cosmoil-
5C₁₈-MS-II,4.6/250 进一步分离纯化,获得一个
主要洗脱峰 F7-1(图 8),其对 10^4 cfu/mL B09、
B18 和 B27 的杀伤指数分别为 30%、40% 和 66%
(图 9)。

2.3 质谱检测抗菌肽纯度

F3-1 组分质谱分析结果 对 F3-1 组分进
行质谱分析,结果显示,在质荷比(m/z)1 000 到
4 000 范围内仅有一个离子峰,说明该组分为单一
蛋白,其分子量为 1 391.82 u(图 10)。

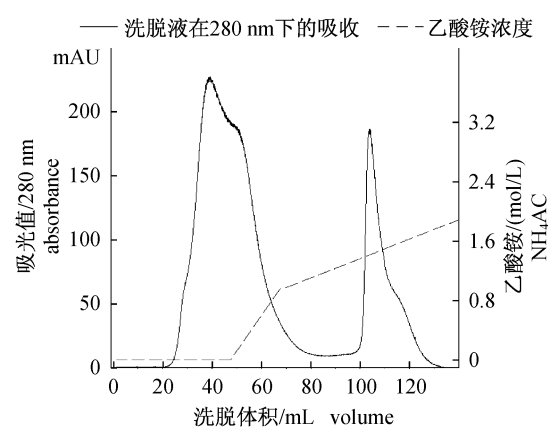


图 6 小于 3 ku 样品阳离子交换层析图谱
主要洗脱组分位于 100 ~ 120 mL,收集该组分。

Fig. 6 Elution profile of the protein sample of
Mw < 3 ku by the cationic exchange
liquid chromatography

The main fraction distributed at 100 mL to 120 mL was
collected.

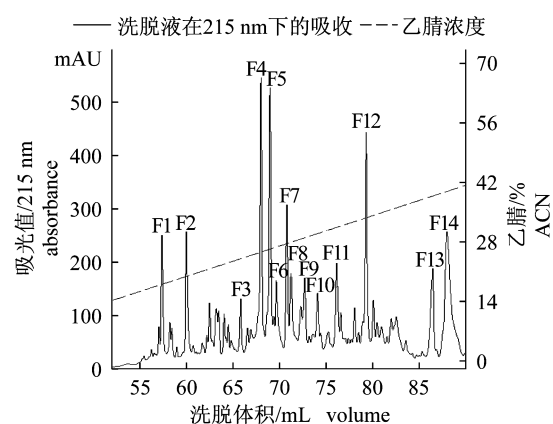


图 7 小于 3 ku 样品阳离子交换洗脱峰经
反相高效液相层析分离图谱
在洗脱体积 55 ~ 90 mL 之间收集到 14 个主要洗脱峰。
Fig. 7 Elution profile of the fractions obtained from
the cationic exchange liquid chromatography of
the protein sample with the Mw < 3 ku
by RP-HPLC

The main fractions of F1 to F14 distributed at 55 mL to 90 mL
were obtained.

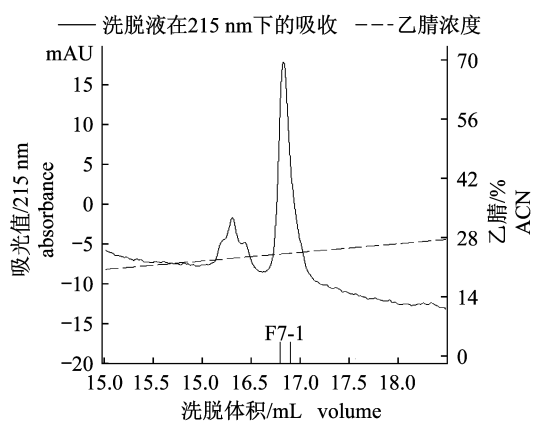


图8 F7组分反相高效液相层析分离图谱

获得一个主要洗脱峰 F7-1。

Fig. 8 Elution profile of the fraction F7 by RP-HPLC

The main fraction of F7-1 was collected.

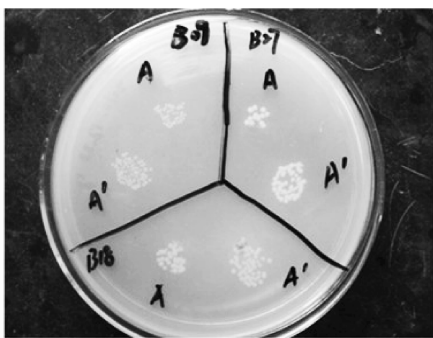


图9 F7-1组分对 10^4 cfu/mL B09、B18 和 B27 的抗菌作用

A. 菌液 + F7-1 样品; A'. 菌液 + 0.85% 生理盐水。

Fig. 9 Antibacterial activities of the fraction F7-1 against 10^4 cfu/mL B09, B18 and B27

A. indicated bacteria mixed with the fraction F7-1; A'. indicated bacteria mixed with the 0.85% saline.

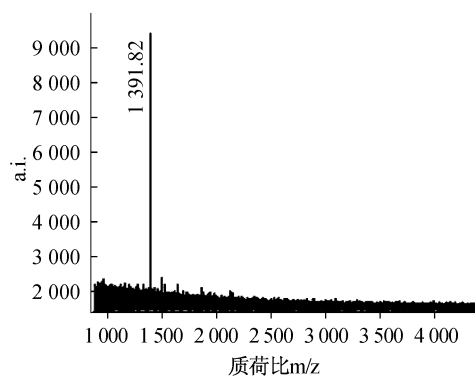


图10 基质辅助激光解吸/离子化飞行时间质谱分析 F3-1 组分分子量

Fig. 10 MALDI-TOF-MS analysis of the fraction F3-1

F7-1 组分质谱分析结果 对 F7-1 组分进行质谱分析,结果显示,质谱图上出现 3 个间隔大致相等的离子峰,质荷比分别为 839.19、861.12 和 877.10,861.12 离子峰可能为 839.19 结合了空气中的一个钠离子,877.10 离子峰可能为 839.19 结合了空气中的一个钾离子,因此这 3 个离子峰应该是由一个蛋白产生的,该蛋白分子量为 839.19 u (图 11)。

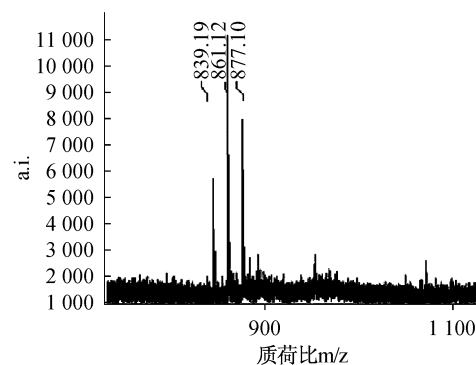


图11 基质辅助激光解吸/离子化飞行时间质谱分析 F7-1 组分分子量

Fig. 11 MALDI-TOF-MS analysis of the fraction F7-1

3 讨论

脾脏是鱼类最主要的免疫器官之一^[14]。在鱼类的脾脏中已证明广泛存在抗微生物活性物质。Ruangsri 等^[15]发现大西洋鳕鱼脾脏酸提取物对柠檬色动性球菌 (*Planococcus citreus*) 和静止嗜冷杆菌 (*Psychrobacter immobilis*) 均有抑制作用。Zou 等^[16]通过 RT-PCR 技术,在正常斑马鱼的脾脏等器官内检测到了 defensin 类抗菌肽的表达。Bao 等^[17]发现正常沟鲈在受到一定浓度鲈鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 浸泡刺激后,脾脏中 LEAP-2 基因的表达水平明显升高。Sun 等^[18]在鳊的脾脏中检出较多 piscidin mRNA。Chen 等^[19]发现 hepcidin 基因在大菱鲆脾脏中表达水平比较高。以上资料说明在鱼类的脾脏中存在多种活性物质有待开发利用。目前尚未见到从日本鳗鲡脾脏中发现抗菌肽的相关文献报道,因此,本实验选择日本鳗鲡脾脏作为分离纯化抗菌肽的材料具有一定的研究意义。

脾脏醋酸粗提物样品经过 10 ku 和 3 ku 切向流纤维柱超滤后分为大于 10 ku、小于 10 ku 和小于 3 ku 3 部分。对 3 种样品进行电泳分析,结果

显示,大于 10 ku 样品分子量大小分布在 6 ku 到 116 ku 之间,说明大于 10 ku 样品的主要成分未透过超滤柱的分子量大于 10 ku 的大分子,可能还含有一些未被去除的脾脏组织杂质,小于 10 ku 和小于 3 ku 样品蛋白组分基本在 10 ku 以下,证明切向流超滤方法能对鳗鲡脾脏样品中不同分子量组分进行有效分段分离。比较 3 部分样品的抗菌活性,小于 3 ku 样品对 B09、B18 和 B27 具有最强的抗菌活性,小于 10 ku 样品对 B09、B18 和 B27 也表现出很强的抗菌活性,而大于 10 ku 样品除对 B09 有一定抗菌作用,对 B18 和 B27 基本无抗菌活性。推断日本鳗鲡脾脏内起抗菌活性作用的主要是一些小分子蛋白。实验选择活性较强的小于 10 ku 和小于 3 ku 样品进一步分离纯化,缩小了分离范围,提高了分离效率。

离子交换层析是根据蛋白质分子在一定的 pH 和离子强度条件下所带电荷的差异进行分离的方法。在一定 pH 条件下,等电点(pI) > pH 的蛋白带正电,能与阳离子交换剂结合,一般 pI 越大的蛋白与离子交换剂结合力越强^[20]。小于 10 ku 样品和小于 3 ku 样品经阳离子交换层析都只出现一个主要洗脱峰,说明主要洗脱峰中大部分蛋白等电点相近,约大于 4。对小于 10 ku 样品和小于 3 ku 样品阳离子交换层析主要洗脱峰采用 pH 9 缓冲液(0.01 mol/L Tris-Cl/2% ACN)进行反相高效液相色谱层析,获得的洗脱峰数量多、峰尖锐对称、不拖尾。说明采用高 pH 值洗脱液获得较好的分离效果。目前已知的反相高效液相色谱层析所使用的流动相的 pH 值在 2 左右,通常是在流动相中添加三氟乙酸(TFA)离子对试剂^[21]。但是也有研究发现,反相高效液相色谱分离对 pH 值缓冲液敏感。左雄军等^[22]建立的分离血水草生物碱 HPLC 新方法,考察了梯度洗脱分离时起始缓冲液 pH 值对分离的影响。当用 0.028 mol/L K_2HPO_4 (pH 7.5) 的高 pH 值缓冲液为起始洗脱液,血水草提取液中主要生物碱得到理想分离,pH 值太低,生物碱在 C_{18} 柱上保留较弱,几种成分不能得到有效的分离。这可能是由于高 pH 值的缓冲液抑制了样品的离子化,使得样品易于在反相柱上进行分配,从而产生最长的保留时间并直接影响分离效果^[23]。

目前还发现一类抗菌肽是一些分子量较大蛋白的一个小片段,统称为“源于其他作用的大分

子蛋白的肽段/片段^[24]。如血红蛋白、组蛋白和血蓝蛋白等,它们也具有广谱的抗菌活性。这些蛋白分子量通常较小,如从大西洋鲑表皮黏液中分离到的抗菌肽 SAMP H1,分子量为 2 836 u,是组蛋白 H1 N-末端小肽片段^[25];从鲟表皮黏液中分离到的抗菌肽 ParasinI,分子量为 2 000.4 u,是组蛋白 H2A N-端的小肽片段^[26]。这些蛋白在生物机体中是独立存在还是在分离过程中因为一些分离条件的影响而从大分子蛋白上脱离下来,其机理还不是很清楚。有研究表明在海洋生物活性肽的分离过程中选择合适的蛋白酶对蛋白的多肽链进行水解切割,可以将具有生物活性的肽片断释放出来^[27]。Wang 等^[28]用 Sephadex LH-20 凝胶层析和 RP-HPLC 从牡蛎(*Crassostrea talienwhanensis crosse*)蛋白水解液中纯化出了一个由 9 个氨基酸残基组成的活性的小肽。Wu 等^[29]通过超滤、凝胶层析、RP-HPLC 从鲨鱼肉的酶解液中分离出 4 个小肽组分。本实验中,粗提阶段采用了沸水浴加热,因此,分离到的 2 个小分子抗菌肽是否是大分子蛋白因加热被降解的片段还有待进一步研究。目前从鱼类中分离到的抗菌肽氨基酸数目在 10 ~ 100 之间,分子量大小为 1 ~ 10 ku 之间^[30-31]。其中最小的抗菌肽 Myxinidin 是 Subramanian 等^[32]从盲鳗的表皮黏液中分离到的,氨基酸数目为 12,分子量为 1 328 u。从分子量上看,这 2 个蛋白不同于以往从鱼类中分离到的抗菌肽。此外,实验过程中使用酸抽提,沸水浴加热,碱性缓冲液 RP-HPLC 分离,说明这 3 个抗菌肽对热、酸、碱均不敏感,可能是一类新的抗菌肽。

参考文献:

- [1] Lee W C, Chen Y H, Lee Y C, *et al.* The competitiveness of the eel aquaculture in Taiwan, Japan, and China [J]. *Aquaculture*, 2003, 221 (1): 115 - 124.
- [2] Chen R D, Zhou Z G, Cao Y N, *et al.* High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 39 - 49.
- [3] Collado R, Fouz B, Sanjuan E, *et al.* Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla* [J]. *Diseases of*

- Aquatic Organisms, 2000, 43(2): 91 - 101.
- [4] 黄文树, 王克坚, 李少菁. 甲壳动物抗菌肽研究进展[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 64 - 68.
- [5] Aranishi F, Nakane M. Epidermal proteases of the Japanese eel[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 16(6): 471 - 478.
- [6] Esteve-Gassent M D, Fouz B, Amaro C. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(2): 93 - 105.
- [7] Tasumi S, Yang W J, Usami T, et al. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2004, 28(4): 325 - 335.
- [8] Ebran N, Julieta S, Orange N, et al. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1999, 122(2): 181 - 189.
- [9] Ebran N, Julien S, Orange N, et al. Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000, 1467(2): 271 - 280.
- [10] Zhang D L, Guan R Z, Huang W S, et al. Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, dio. 10. 1016/j. fsi. 2012. 08. 022.
- [11] Bonetto V, Andersson M, Bergman T, et al. Spleen antibacterial peptides: high levels of PR-39 and presence of two forms of NK-lysin [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999, 56(1 - 2): 174 - 178.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254.
- [13] 陆婕, 汪俊汉, 钟雅, 等. 弱酸性家蝇蛆抗菌肽 MD7095 的分离纯化及性质研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 406 - 411.
- [14] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648 - 654.
- [15] Ruangsri J, Fernandes J M O, Brinchmann M, et al. Antimicrobial activity in the tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5 - 6): 879 - 886.
- [16] Zou J, Mercier C, Koussounadis A, et al. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 638 - 647.
- [17] Bao B, Peatman E, Xu P, et al. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated [J]. Molecular Immunology, 2006, 43(4): 367 - 377.
- [18] Sun B J, Xie H X, Song Y, et al. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong to one family: the piscidins [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(6): 335 - 343.
- [19] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(3): 172 - 181.
- [20] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 10 - 80.
- [21] 张华, 王俊德, 钟虹敏, 等. 反相高效液相色谱法分离蛋白质的研究 [J]. 色谱, 1998, 16(3): 220 - 222.
- [22] 左雄军, 李静. 血水草生物碱的 HPLC 分离 [J]. 分析测试学报, 1999, 18(6): 50 - 52.
- [23] Carr D. The Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by Reversed-Phase HPLC [M]. USA: Grace Vydac Advances, 2002: 20 - 23.
- [24] Smith V J, Desbois A P, Dyrinda E A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and microalgae [J]. Marine Drugs, 2010, 8(4): 1213 - 1262.
- [25] Lüders T, Birkemo G A, Nissen-Meyer J, et al. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of atlantic salmon [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(6): 2399 - 2406.
- [26] Park I Y, Park C B, Kim M S, et al. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish *Parasilurus asotus* [J]. FEBS Letters,

- 1998,437(3):258-262.
- [27] 胡文婷,张凯. 酶解海洋生物源蛋白制备活性肽研究进展[J]. 海洋科学,2010,34(5):83-88.
- [28] Wang J P, Hu J N, Cui J Z, *et al.* Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry,2008,111(2):302-308.
- [29] Wu H, He H L, Chen X L, *et al.* Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate[J]. Process Biochemistry,2008,43(4):457-461.
- [30] 梁英,黄文树,关瑞章,等. 鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽研究进展[J]. 水生生物学报,2009,33(5):963-969.
- [31] Rajanbabu V, Chen J Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future[J]. Peptides,2011,32(2):415-420.
- [32] Subramanian S, Ross N W, MacKinnon S L. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L [J]. Marine Biotechnology,2009,11(6):748-757.

Isolation of antibacterial peptides with low molecular weight from the spleen of *Anguilla japonica*

LIANG Ying^{1,2}, GUAN Ruizhang^{1,2*}, HUANG Wenshu^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The acetic acid extract of the spleen from Japanese eel, *Anguilla japonica*, was separated by tangential flow ultrafiltration with 10 and 3 ku fibre columns, and the two protein samples of the molecular weight (Mw) < 10 ku and the Mw < 3 ku were purified by using the cationic exchange liquid chromatography together with reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The results showed that three compositions (the protein samples of Mw > 10 ku, Mw < 10 ku and Mw < 3 ku) were separated from the acid extract with two fibre columns. The samples of Mw < 10 ku and Mw < 3 ku exhibited stronger antibacterial activity than the protein sample of the Mw > 10 ku. The protein sample with the Mw < 10 ku was purified by the cationic exchange liquid chromatography and using pH 9 buffer solution in RP-HPLC, and we obtained an antibacterial peptide with the molecular weight of 1 391. 82 u when determined by MALDI-TOF MS. The pH 9 and the pH 2 buffer solutions were applied in RP-HPLC of the factions obtained from cationic exchange liquid chromatography of the protein sample with the Mw < 3 ku, and we also obtained an antibacterial peptide with the molecular weight of 839. 19 u when determined by MALDI-TOF MS. This study suggests that the main antibacterial components in the spleen of *A. japonica* are the proteins of low molecular weight.

Key words: *Anguilla japonica*; spleen; antibacterial peptide; isolation

Corresponding author: GUAN Ruizhang. E-mail: rzguan@jmu.edu.cn