

# 家蚕抗菌蛋白 Cecropin D 和 Lysozyme 的分离纯化及性质鉴定

陈玉清 李保存 吴希 张双全

( 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097 )

[ 摘要 ] 经大肠杆菌 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 诱导后的家蚕幼虫, 其免疫血淋巴经 CM-Sepharose CL-6B 离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析及 HPLC 分离后, 得到 2 种抗菌蛋白, 经液相色谱-电喷雾质谱( ESI-MS )分析鉴定, 纯化的 2 种抗菌蛋白分别是家蚕抗菌肽 cecropin D 和溶菌酶 lysozyme。酸性电泳( A-PAGE )测活免疫血淋巴得到抗菌蛋白活性谱, cecropin D 在 8 h 无显著表达, 12 h 有较强抗菌活性, 30 h 达到最高, 以后逐渐降低; lysozyme 在 8 h 后检测到表达, 12 h 到达高峰, 之后逐渐下降, 48 h 的血淋巴中未检测到明显的表达。研究认为抗菌蛋白 lysozyme 和 cecropin D 是家蚕幼虫感染细菌 8 h 后大量表达的抗菌蛋白, 主要参与细菌感染 12 ~ 30 h 的血淋巴对细菌的清除, 是参与家蚕幼虫抗菌免疫的重要蛋白。

[ 关键词 ] 家蚕( *Bombyx mori* ) cecropin D lysozyme 纯化 活性

[ 中图分类号 ] Q966 [ 文献标识码 ] A [ 文章编号 ] 1001-4616( 2006 )03-0103-05

## The Purification and Identification of the Antibacterial Peptides Cecropin D and Lysozyme from Silkworm Larvae, *Bombyx mori*

Chen Yuqing, Li Baocun, Wu Xi, Zhang Shuangquan

( Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, School of Life Science,  
Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China )

**Abstract** Injection of *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> into Chinese silkworm larvae, *Bombyx mori*, the antibacterial activity is detected in the hemolymph. After being separated by CM-Sepharose Cl-6B, sephadex G-100 chromatography and HPLC, two antibacterial proteins are identified. These two proteins are antibacterial peptide cecropin D and lysozyme identified by ESI-MS. Testing antibacterial activity by A-PAGE analyses reveals that both cecropin D and lysozyme are not detected before 8h after *E. coli* injection. Lysozyme reaches to the maximal level at 12 h and then gradually decreases. Cecropin D is detected in induced hemolymph at 12 h and 30 h. These two antibacterial proteins are almost not detectable at 48 h. Results show that cecropin D and lysozyme play a vital role in antibacterial immunity of silkworm at 12 h-36 h.

**Key words** silkworm( *Bombyx mori* ), cecropin D lysozyme, purification, activity

### 0 引言

昆虫具有先天免疫系统, 以抵抗细菌、真菌或病毒等微生物的入侵。昆虫的免疫过程由不同免疫基因共同参与, 这些免疫基因在非诱导情况下一般不表达或以低水平组成性表达, 由细菌诱导表达的抗菌蛋白大多主要在脂肪体细胞中表达, 而后释放到血淋巴中<sup>[1]</sup>。已有研究指出, 昆虫在细菌细胞壁成分脂多糖、肽聚糖、花生四烯酸等物质免疫刺激后, 常常在 1 至数小时内表达抗菌蛋白参与抗菌免疫<sup>[2-4]</sup>。昆虫免疫反

收稿日期: 2005-10-20.  
基金项目: 南京师范大学校青年基金资助项目( 2001SWXXQNBQ12 ).  
作者简介: 陈玉清, 女, 1974—, 讲师, 主要从事生物化学的教学与研究. E-mail: chenyuqing@njnu.edu.cn  
通讯联系人: 张双全, 1952—, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学的教学与研究. E-mail: jsdeer@163.com

应产生的抗菌蛋白包括 cecropins 家族抗菌肽、防御肽( defensins )、富含 gly 的抗菌肽、富含 pro 的抗菌肽以及溶菌酶( lysozyme )等几大类<sup>[5]</sup>。家蚕( *Bombyx mori* )受到细菌感染后可能产生多种抗菌蛋白,已鉴定出的抗菌蛋白包括 cecropin A、cecropin B、cecropin D、enbocin、moricin 以及 lebocin 等抗菌小肽<sup>[1]</sup>,一般由 40 个左右的氨基酸组成,相对分子质量较小,它们与一些分子较大的抗菌蛋白如 lysozyme 和 attacin 等在家蚕抗菌免疫防御中发挥重要作用<sup>[6,7]</sup>。尽管家蚕体内有多种抗菌蛋白参与免疫,但它们在家蚕体内的表达与否以及丰度受到多种因素的影响,其抗菌谱也各不相同。本文鉴定了中国家蚕受到细菌感染后起主要作用的抗菌蛋白,探讨了其在家蚕抗菌免疫中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 家蚕来源与处理

家蚕( 苏 5 × 苏 6 )材料来自中国蚕业研究所。取 5 龄 3 d 幼虫,体表消毒后皮下注射 20  $\mu$ L 诱导液( *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 10<sup>8</sup> cells/mL ),同时取部分幼虫注射昆虫生理盐水( 130 mmol/L NaCl + 0.005 mmol/L KCl )20  $\mu$ L 作为对照。血淋巴的获得按常规方法进行。

### 1.2 抗菌蛋白的分离纯化

#### 1.2.1 主要试剂

CM-Sepharose CL-6B、Sephadex G-100 均系 Pharmacia Biotech 产品;标准蛋白质分子量 Marker 为 Fermentas 产品,其它各种试剂为国产,分析纯。

#### 1.2.2 抗菌活性的测定

测活菌 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 采用混菌平皿孔穴法<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.3 CM-Sepharose CL-6B 与 Sephadex G-100 层析

收集 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 诱导 30 h 的家蚕免疫血淋巴,冰浴中调整 pH 至 5.0 进行酸沉淀后,10 000 r/min, 5 min 离心去除部分杂蛋白,上清液经 CM-Sepharose CL-6B 阳离子交换柱( 2 × 15 cm ) 200 mL 0.05 mol/L 对 200 mL 1 mol/L HAc-NH<sub>4</sub>Ac( pH5.1 )梯度洗脱,流速 0.5 mL/min,收集有抗菌活性的部分,冷冻干燥后,进行 Sephadex G-100 凝胶过滤层析( 1.8 × 80 cm )。洗脱缓冲液为 pH 5.1 的 NH<sub>4</sub>Ac,流速 0.2 mL/min,收集有抗菌活性的部分。层析分析在 BIO-RAD Biologic LP 上进行。

#### 1.2.4 HPLC 分析

自动进样 150  $\mu$ L 后,用 0.02 mol/L 的 NH<sub>4</sub>Ac 缓冲液( pH 5.1 )洗脱,洗脱时间 30 min,分离柱 Protein-Pak<sup>TM</sup> P10( OH ) 10  $\mu$ m( 7.8 × 300 mm ),在 Agilent HPLC 1100 层析仪上进行。

### 1.3 抗菌蛋白的鉴定

#### 1.3.1 A-PAGE 电泳染色与抗菌活性测定

电极缓冲液 pH 4.1(  $\beta$ -丙氨酸 + 冰乙酸 ),凝胶浓度为 15%,100 V 电泳至甲基绿指示剂到达凝胶底部,凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。凝胶中蛋白质抗菌活性检测基本按文献进行<sup>[8]</sup>,电泳结束后,用灭菌 LB 液体培养基洗涤凝胶 45 min 后,覆盖含 1% 对数生长期 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 的 LB 固体培养基,37℃ 培养过夜。

#### 1.3.2 液相色谱-电喷雾质谱( ESI-MS )分析

待测蛋白质经 Trypsin 酶解后进行 ESI-MS,检测方式正离子, Metal Needle 进样,毛细管温度 200℃, Sheath gas 35 arb, RP-18 柱( 0.15 mm × 120 mm ),扫描范围 400 ~ 2 000 DAL,由中国科学院上海生命科学研究院生化与细胞所蛋白质组研究分析中心完成。

### 1.4 *E. coli* 诱导不同时间血淋巴中抗菌蛋白检测

分别如 1.1 中所述诱导家蚕幼虫 8 h、12 h、30 h、36 h 和 48 h,每个时间点处理 10 头幼虫,诱导不同时间后收集血淋巴。取诱导不同时间的血淋巴 15  $\mu$ L 进行 A-PAGE 电泳并测定凝胶中蛋白质的抗菌活性,按 1.3.1 所述进行。

2 结果与分析

2.1 抗菌蛋白的分离纯化与鉴定

经酸沉淀的诱导血淋巴上 CM-Sepharose CL-6B 柱后,200 mL 0.05 mol/L 对 200 mL 1 mol/L HAc-NH<sub>4</sub>Ac (pH 5.1)梯度洗脱,收集到具有抗菌活性的洗脱组分(图 1. A),进一步经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析分离,收集到具有抗菌活性的组分(图 1. B),经 HPLC 分离得到有 2 个峰的层析图谱(图 1. C). 对每个峰对应组分进行抗菌活性检测,结果表明峰 2 具有抗菌活性. 另外,诱导血淋巴上 CM-Sepharose CL-6B 柱后的样品流出液发现具有抗菌活性,冷冻干燥后经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析,收集到具有抗菌活性的部分(图 2. A),HPLC 分离后得到 7 个峰. 对每一个峰对应样品进行抗菌活性检测,结果表明峰 7 对应组分具有抗菌活性(图 2. B). 对经上述纯化得到的 2 个有抗菌活性的组分进行 A-PAGE 电泳检测,结果均为单一的电泳条带(图 3). 对分离纯化得到的 2 个抗菌蛋白分别进行 ESI-MS 质谱分析鉴定,结果表明它们分别为家蚕抗菌肽 cecropin D 和 lysozyme. cecropin D 为约 4 000 Da 的抗菌肽,lysozyme 为约 16 000 Da 的家蚕溶菌酶.

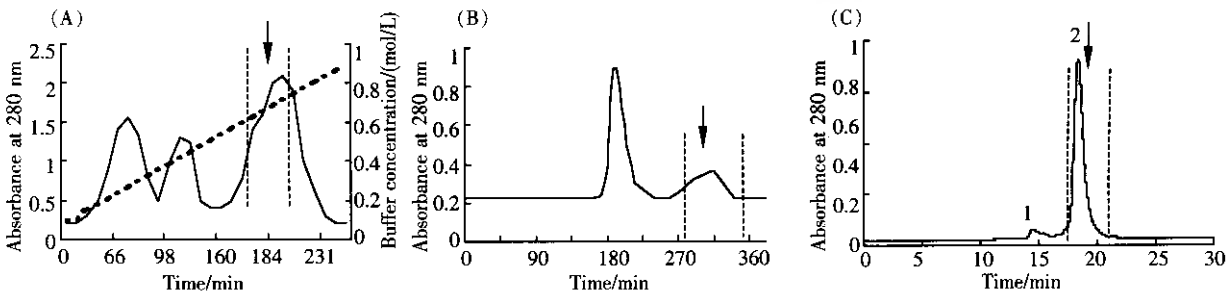


图 1 诱导家蚕血淋巴中 lysozyme 的分离

(A) CM-Sepharose CL-6B 离子交换层析; (B) Sephadex G-100 分子筛层析; (C) HPLC 层析  
(箭头所指为检测到有抗 *E.coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 活性的部分)

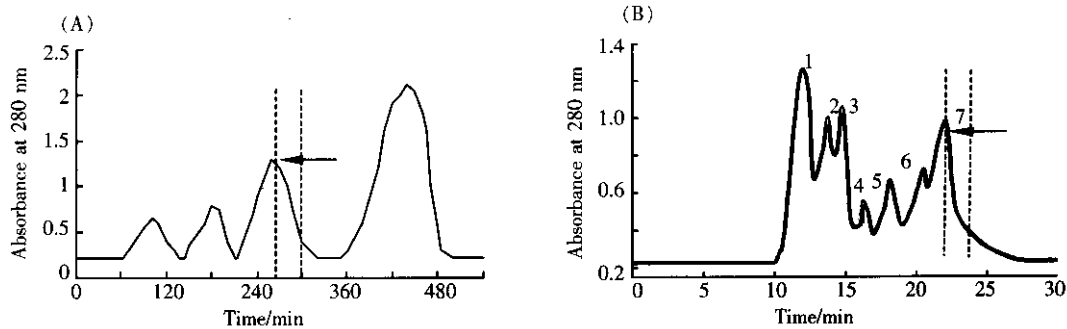


图 2 诱导家蚕血淋巴中 cecropin D 的分离

(A) Sephadex G-100 分子筛层析; (B) HPLC 层析 (箭头所指为检测到有抗 *E.coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 活性的部分)

2.2 *E. coli* 感染不同时间血淋巴中的抗菌蛋白

分别对诱导 8 h、12 h、30 h、36 h 和 48 h 的血淋巴进行酸性电泳 (pH 4.1) 与抗菌活性测定. 检测到 2 种抗菌蛋白的抑菌斑(图 4), 表明家蚕幼虫感染细菌后可诱导表达碱性抗菌蛋白. 从电泳抑菌图谱可见, lysozyme 在 8 h 的诱导血淋巴中未检测到抗菌活性, 12 h 检测到最强的活性, 在诱导 30 h ~ 36 h 的样品中, 均检测到 lysozyme 的存在. 随着诱导时间的增加, 抑菌斑越来越小, 在 48 h 的样品中, 仅检测到极弱 lysozyme 的抗菌活性. 可见 lysozyme 是家蚕幼虫体内参与防御的主要大分子抗菌蛋白, 抗菌活性强, 在家蚕抗菌免疫反应的 12 h ~ 36 h 起重要作用. 家蚕抗菌肽 cecropin D 在细菌诱导 8 h 的血淋巴电泳抗菌活性测定中未见抑菌圈, 在 12 h 的血淋巴则检测到中 cecropin D 的抗菌活性, 30 h 抗菌抑菌圈最大, 抗菌活性最强, 但 30 h 以后明显减弱, 48 h 的血淋巴中几乎检测不到 cecropin D 的抑菌作用. 可见抗菌肽 cecropin D 是家蚕血淋巴中参与抗菌免疫的主要抗菌小肽.



图 3 分离的抗菌活性组分的 A-PAGE 电泳

1: 诱导 30 h 的家蚕血淋巴; 2: 纯化后经 ESI-MS 鉴定的 cecropin D; 3: 纯化后经 ESI-MS 鉴定的 lysozyme

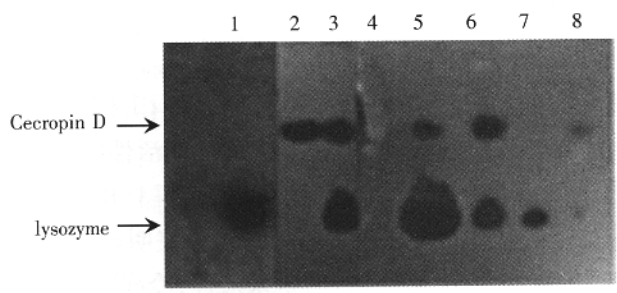


图 4 诱导不同时间的家蚕血淋巴的 A-PAGE 电泳抗菌活性测定

1: 纯化 lysozyme; 2: 纯化 cecropin D; 3: 诱导 30 h; 4: 诱导 8 h; 5: 诱导 12 h; 6: 诱导 30 h; 7: 诱导 36 h; 8: 诱导 48 h

### 3 讨论

Lysozyme 是家蚕体内的一个抗菌蛋白,对 *E. coli* 和 *M. luteus* 均有抗性,lysozyme 基因在体内低水平组成性表达,在细菌诱导后呈上调表达<sup>[6]</sup>,具体的表达规律未见详细报道. 本研究发现,lysozyme 在 8 h 的诱导血淋巴中未检测到明显的抗菌活性,但在诱导 12 h 检测到最强的活性,在诱导 30 h、36 h 的血淋巴中,均能检测到 lysozyme 的存在与活性. 表明 lysozyme 是家蚕幼虫体内参与防御的主要抗菌蛋白,抗菌活性强,在家蚕抗菌免疫反应的 12 h ~ 36 h 起重要作用. 实验中发现,随着诱导时间的增加,lysozyme 在血淋巴中活性逐渐降低,特别是在诱导 48 h 的血淋巴中,仅检测到极弱的活性,可能是由 lysozyme 表达量的减少以及自身的降解引起.

Cecropin D 是家蚕体内 cecropins 家族的一种抗菌小肽<sup>[9]</sup>,本研究成功将其分离并鉴定. 进一步检测了 cecropin D 在对细菌诱导的家蚕血淋巴中的活性,发现 cecropin D 在血淋巴中活性规律与 lysozyme 相似,在 8 h 无显著表达,12 h 的血淋巴中检测到抗菌活性,30 h 的血淋巴中 cecropin D 活性达到最高,以后逐渐降低. Yang 等从基因转录水平研究指出抗菌肽 cecropin D 基因表达在细菌诱导 4 h 后检测到,24 h 后达最大,并可一直持续到 48 h<sup>[10]</sup>. 本研究结果与其基本一致,诱导初期在转录水平检测到 cecropin D 的低水平表达,在血淋巴中该蛋白含量低,因此未检测出活性. 本研究从抗菌活性上未检测到其它抗菌肽. Kim 等发现,家蚕抗菌肽 enbocin 在细菌诱导 4 h 后表达,16 h 达最高,以后逐渐降低<sup>[11]</sup>. Chowdhury 等研究发现,家蚕抗菌肽 lebocin 在生理条件下表现出微弱的抗菌活性,其在自我防御中的生物学功能至今仍不清楚<sup>[12]</sup>. 而碱性很强的抗菌肽 moricin,则主要负责体内对  $G^+$  细菌的抗菌活性<sup>[13]</sup>. 我们实验室曾鉴定的活性最强的抗菌肽 CM4,本研究中也未检测到有明显表达. 因此尽管已从家蚕体内分离到多种抗菌肽,但其在抗菌免疫中是否被诱导以及表达的丰度等可能会受到多种因素的影响,包括家蚕的品种、诱导源的差异、生活的环境以及纯化检测活性的方法等.

本研究从表达水平上直接检测血淋巴中抗菌蛋白的活性,认为 cecropin D 和 lysozyme 是家蚕参与抗菌免疫的 2 种主要抗菌蛋白,在家蚕幼虫感染细菌后被大量诱导表达并释放到血淋巴中,并且在诱导后 12 h ~ 36 h 的血淋巴中活性最强.

### [ 参考文献 ]

[ 1 ] Yamakawa M, Tanaka H. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori* [ J ]. Developmental and Comparative Immunology, 1999, 23( 4 ) : 281 - 289.  
[ 2 ] Taniai K, Furukawa S, Shono T, et al. Elicitors triggering the simultaneous gene expression of antibacterial proteins of the silkworm, *Bombyx mori* [ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1996, 226( 3 ) : 783 - 790.

- [ 3 ] Taniai K ,Wago H ,Yamakawa M. In vitro phagocytosis of Escherichia coli and release of lipopolysaccharide by adhering hemocytes of the silkworm ,Bombyx mori[ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 1997 , 231( 3 ) :623 – 627.
- [ 4 ] Morishima I ,Yamano Y ,Inoue K ,et al. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm ,Bombyx mori[ J ]. FEBS Letters , 1997 , 419( 1 ) :83 – 86.
- [ 5 ] 洪华珠 ,彭蓉 ,彭建新,等. 新型抗感染生物活性物质——昆虫抗菌肽的研究进展[ J ]. 华中师范大学学报 :自然科学版 , 2003 , 37( 3 ) :395 – 398.
- [ 6 ] Lee W J ,Brey P T. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm Bombyx mori[ J ]. Gene , 1995 , 161( 2 ) :199 – 203.
- [ 7 ] Sugiyama M ,Kuniyoshi H ,Kotani E ,et al. Characterization of a Bombyx mori of the cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins[ J ]. Insect Biochem Mol Biol , 1995 , 25( 3 ) :385 – 392.
- [ 8 ] Hultmark D ,Engstrom A ,Bennich H ,et al. Insect immunity :isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial component from cecropin pupae[ J ]. Eur J Biochem , 1982 , 127( 1 ) :207 – 217.
- [ 9 ] Hara S ,Taniai K ,Kato Y ,et al. Isolation and  $\alpha$ -amidation of the non-amidated form of cecropin D from larvae of Bombyx mori[ J ]. Comp Biochem Physiol , 1994 , 108( 3 ) :303 – 308.
- [ 10 ] Yang J ,Furukawa S ,Sagisaka A ,et al. cDNA cloning and gene expression of cecropin D , an antibacterial protein in the silkworm , Bombyx mori[ J ], Comp Biochem Physiol , 1999 , 122( 4 ) :409 – 414.
- [ 11 ] Kim S H ,Park B S ,Yun E Y ,et al. Cloning and expression of a novel gene encoding a new antibacterial peptide from silkworm , Bombyx mori[ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 1998 , 246( 2 ) :388 – 392.
- [ 12 ] Chowdhury S ,Taniai K ,Hara S ,et al. cDNA cloning and gene expression of lebecin , a novel member of antibacterial peptides from the silkworm ,Bombyx mori[ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 1995 , 214( 1 ) :271 – 278.
- [ 13 ] Hara S ,Yamakawa M. Moricin , a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm ,Bombyx mori[ J ]. J Biol Chem , 1995 , 270( 50 ) :29923 – 29927.

[ 责任编辑 孙德泉 ]