

黄粉虫抗菌肽的提取及其生化特性的研究*

朱小奇** 谢彩云 聂荷敏 赵 肖 陈小娜 何晓辉

宋 欢 王俊刚 申 红***

(石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

摘 要 【目的】测定黄粉虫 *Tenebrio molitor* Linnaeus 幼虫抗菌肽提取液的浓度、抑菌活性及其部分生化特性和凝血效应。【方法】本实验用浓度为 1×10^8 CFU/mL 大肠杆菌 *Escherichia coli* 诱导 5 龄黄粉虫幼虫, 分别在诱导 12、24、36、48、60 和 72 h 后提取其中的抗菌肽, 并用考马斯亮兰法测定抗菌肽粗提液蛋白的浓度, 并用滤纸片法测定其抑菌活性, 同时对其热稳定性、反复冻融稳定性、蛋白酶稳定性及不同 pH 对其活性的影响等生化特性及凝血效应进行了探究。【结果】经大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽粗提液的蛋白浓度均显著高于未诱导的黄粉虫组 ($P < 0.01$), 且在诱导 48 h 时产生的抗菌肽提取液蛋白的浓度最高, 产生的抑菌圈直径也显著高于未诱导的黄粉虫组 ($P < 0.05$), 生化特性的测定结果显示, 黄粉虫抗菌肽有较好的热稳定性、酶稳定性及酸碱稳定性, 反复冻溶后对其抑菌活性影响不大, 并且无凝血效应。【结论】大肠杆菌可以刺激黄粉虫的免疫系统, 增加抗菌肽的表达量, 使其产生浓度高、活性强的抗菌肽, 且生化特性较稳定。本研究对黄粉虫抗菌肽作为绿色抗生素用于畜牧养殖业的进一步开发与利用提供了科学的理论依据。

关键词 黄粉虫, 抗菌肽, 浓度, 抑菌活性, 生化特性

The biological properties of an antimicrobial peptide extracted from *Tenebrio molitor*

ZHU Xiao-Qi** XIE Cai-Yun NIE He-Min ZHAO Xiao CHEN Xiao-Na
HE Xiao-Hui SONG Huan WANG Jun-Gang SHEN Hong***

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract [Objectives] To determine the concentration and antibacterial activity of an antimicrobial peptide (AMPs) extracted from *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae, and to explore its biological properties. [Methods] AMP production was induced in five-day old *Tenebrio molitor* larvae by *Escherichia coli* at a concentration of 1×10^8 CFU/mL. AMPs were extracted from the larvae at 12, 24, 36, 48, 60, and 72 h respectively, their concentration detected by coomassie brilliant blue stain and their antibacterial activity measured using the filter paper method. In addition, other features, such as thermal stability, stability after repeated freezing and thawing, proteinase stability, effect of different pH and coagulation, were also measured. [Results] The results show that inducing the production of AMPs with *E. coli* resulted in a significantly higher concentration of AMPs being extracted from *T. molitor* ($P < 0.01$). AMP levels were highest at 48 h. Moreover, the diameter of bacterial inhibition caused by AMPs induced by *E. coli* was significantly larger ($P < 0.05$). AMPs extracted from *T. molitor* were stable with respect to variation in temperature, proteinase and pH. Repeated freezing and thawing had little effect on the biological properties of AMPs, including coagulation. Therefore, the immune system of *T.*

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31060281); 国家大学生创新创业训练计划 (201410759068); 石河子大学大学生创新创业训练计划 (SRP2014218)

**第一作者 First author, E-mail: 805746927@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenhong98@163.com

收稿日期 Received: 2014-06-07, 接受日期 Accepted: 2014-09-16

molitor produces a higher concentration of AMPs with better biological stability and antibacterial activity, and no coagulation, following induction by *E. coli*. [Conclusion] These results have laid a theoretical basis for further utilization of antibacterial peptides extracted from *T. molitor*.

Key words *Tenebrio molitor*, antimicrobial peptide, concentration, antibacterial activity, biological characters

目前, 全球抗生素药物的滥用, 越来越多的细菌可能发展成为对传统抗生素耐药的菌株, 因此, 人们迫切地寻找能够代替传统抗生素的药物, 致使抗菌肽的研究受到广泛重视。全球许多科研人员都在致力于抗菌肽作用机制、药物疗效、安全性等的研究(陈冠楠等, 2014)。昆虫是地球上种类最多、数量最大的生物类群, 其防御系统独特, 当受到某些物理刺激或微生物感染后, 会引起免疫反应, 产生一系列抗菌物质, 其中最重要的是抗菌肽。昆虫抗菌肽种类繁多, 不同的诱导和分离方法均有可能获得不同的抗菌肽, 迄今为止, 已经发现 200 多种(Orsolya, 2005), 其主要由昆虫脂肪体产生, 含 10~50 个氨基酸, 大多数为阳离子肽, 具有水溶性好、热稳定高、活性广泛、细菌不易产生耐药性等优点(Hancock and Lehrer, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Zasloff, 2002; 吴甜甜和杨洁, 2009)。另外, 昆虫抗菌肽还能选择性地迅速杀灭耐药性细菌, 并且在动物机体的免疫反应(炎症反应、伤口愈合或获得性免疫系统调控)和维持稳态中发挥着多种功能(Zasloff, 2002; Auvynet and Rosenstein, 2009; 唐馨等, 2011; Zimmerman *et al.*, 2011)。

黄粉虫 *Tenebrio molitor* Linnaeus, 别名黄粉甲、大黄粉虫, 俗称面包虫, 属于鞘翅目拟步甲科拟步甲属, 是目前饲养量较大的一种资源性昆虫, 饲养简单, 抗病力强, 作为优质蛋白替换鱼粉添加到饲料中不仅能促进动物生长而且还增强抗病能力和提高免疫力等(孙龙等, 2012; 阮华波, 2012)。国外学者曾以大肠杆菌 *Escherichia coli* 为诱导源, 从其血淋巴中分离到一种含 43 个氨基酸残基碱性多肽, 命名为 Tenecin 1, 对革兰氏阳性菌尤其是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌有较好抑制作用(Moon *et al.*, 1994)。随着抗菌肽研究的逐步深入, 又发现 Tenecin 1 蛋白片

段中对应的 C-末端 β -折叠区域不仅对革兰氏阳性菌有抑制作用而且对革兰氏阴性菌和真菌也有抑制作用, 同时还发现, 这些片段主要是通过对靶细胞膜上正静电荷的作用而使其流溢死亡(Lee *et al.*, 1998)。近年来, 国内针对黄粉虫抗菌肽的诱导条件、分离纯化、对靶细胞的作用机制及其基因克隆等方面已经有一些研究(韩润林等, 1998; 王小平等, 2000; 王立新等, 2008; 刘颜岗等, 2009; 陶淑霞等, 2009; 樊宏英等, 2011; 唐馨等, 2011), 但对诱导产生高浓度、高活性抗菌肽的时间, 及其生化特性和凝血活性的研究报告还很少。因此, 本试验探索用大肠杆菌刺激黄粉虫幼虫, 诱导其产生抗菌肽, 并测定在诱导的不同时间产生抗菌肽的浓度、抑菌活性, 并探讨其部分生化特性及凝血效应, 旨在将来采用分子生物学和基因工程技术, 将黄粉虫抗菌肽基因重组到微生物体内使其产生高活性的抗菌肽, 从而为其作为新型的绿色抗生素提供新的思路和科学依据。

综上所述, 昆虫抗菌肽将可能成为新一代的临床抗菌药物, 在生物农药、生物饲料添加剂、天然食品防腐剂和动植物抗病基因工程等方面都可能得到广阔的应用(Rahnamaeian *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009; 肖明珠等, 2010; 黄现青等, 2010)。因此, 探讨大肠杆菌诱导黄粉虫产生高浓度、高活性抗菌肽的时间及其生化特性和凝血效应, 将为今后昆虫抗菌肽部分或者完全替代抗生素应用于畜牧养殖业的疾病预防和治疗奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫 黄粉虫 *Tenebrio molitor* Linnaeus 由石河子大学农学院昆虫实验室提供。

1.1.2 菌种 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25952 标准菌株由石河子大学动物科技学院微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 黄粉虫抗菌肽诱导 挑选体重相近的 5 龄黄粉虫幼虫 300 头, 随机分成 2 组, 每组 3 个重复, 每个重复 50 头。试验组为大肠杆菌诱导组(采用浓度为 1×10^8 CFU/mL 大肠杆菌 1 μ L 分别从黄粉虫腹部背面注射)和对照组(采用微量注射器针刺黄粉虫的腹部背面)。将以上试验组处理的黄粉虫幼虫置于温度为 25~32℃, 相对湿度为 65%~70% 的条件下正常饲喂, 于饲喂 12、24、36、48、60 和 72 h 后挑取活的虫体, 以备测定黄粉虫抗菌肽浓度、抑菌活性, 探究其部分生化特性及凝血效应。

1.2.2 黄粉虫抗菌肽的提取 选取大肠杆菌诱导不同时间的黄粉虫幼虫, 用蒸馏水反复冲洗, 并用 75% 乙醇消毒, 吸干虫体表面液体, 称量后置于研钵中, 按重量/体积比为 1:3 加入提取液(0.05 mol/L pH=5 的乙酸铵缓冲液, 35 μ g/mL 苯甲基磺酰氟 PMSF, 2% 巯基乙醇), 充分研磨, 匀浆液在 4℃, 12 000 r/min 高速冷冻离心 30 min 取上清液, 重复 3 次, 合并上清液, 随后放至 100℃ 的恒温水浴箱中水浴 5 min, 然后以 4 800 r/min (4℃) 离心 30 min, 去除变性蛋白, 用灭菌好的注射器抽取不含油层的上清液, 装于小试管中标记后放于 -20℃ 冰箱中冷冻备用。

1.2.3 黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度测定 用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度。以标准蛋白浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光值 OD_{595} 为纵坐标绘图。用分光光度计测定试验组和对照组黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白的 OD_{595} 值, 根据标准曲线确定试验组抗菌肽粗提液蛋白的浓度。

1.2.4 黄粉虫抗菌肽粗提液抑菌活性测定 采用滤纸片扩散法, 取 20 μ L 麦氏比浊法稀释的浓度为 1×10^8 CFU/mL 大肠杆菌均匀涂布于普通琼脂平板中, 将直径为 6 cm 的滤纸片消毒后放入抗菌肽粗提液和抗生素(青霉素浓度为 64

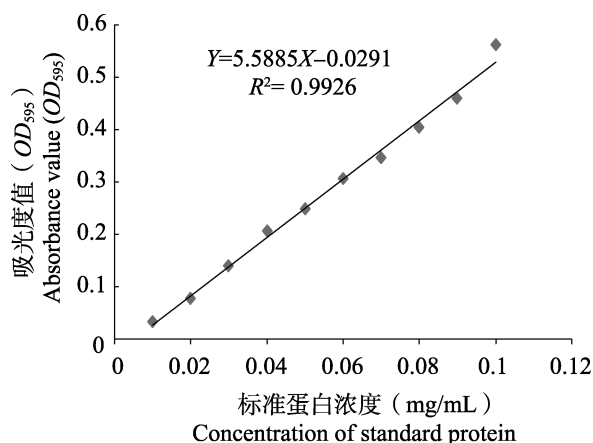


图 1 标准蛋白曲线

Fig. 1 Standard protein curve

μ g/mL) 中浸泡 2~5 min 后, 用无菌镊子拿出常温放置 5 min, 即成药敏纸片, 在每个涂好大肠杆菌的平板中分别放入不同处理的黄粉虫幼虫抗菌肽粗提液和抗生素制成的药敏纸片, 各纸片中心距离应大于 24 mm, 纸片距培养皿内缘应大于 15 mm, 置 37℃ 温箱中培养 24 h, 用游标卡尺测量抑菌圈大小, 做 3 次重复并记录数据。

1.2.5 黄粉虫抗菌肽粗提液部分生化特性的研究

1.2.5.1 热稳定性 将大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽粗提液分别于 50、60、70、80、90℃ 和 100℃ 水浴中加热 10 min, 12 000 r/min (4℃) 离心 15 min, 收集上清液, 测定对大肠杆菌的抑菌活性, 每个处理设 3 次重复, 以不经热处理的样品作为对照, 将对照的抑菌活性定为 100%。

1.2.5.2 反复冻融的稳定性 将大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽粗提液置于 -20℃ 冰箱分别反复冻融 1、2、4、6、8 和 10 次, 12 000 r/min (4℃) 离心 15 min, 收集上清液, 测定其对大肠杆菌的抑菌活性, 每个处理设 3 次重复, 以不经冻融处理的样品作为对照, 将对照的抑菌活性定为 100%。

1.2.5.3 不同 pH 处理对抗菌肽活性的影响 用盐酸和氨水配置 pH 分别为 1、3、5、7、9 的溶液, 将这些溶液分别与经诱导产生的抗菌肽提取液等体积混合, 室温放置 1 h 后检测其抑菌活性, 以加等量生理盐水的抗菌肽提取液作对照, 每个处理设 3 次重复。以不经 pH 处理的样品作为对照, 将对照的抑菌活性定为 100%。

1.2.5.4 对蛋白酶稳定性 在 37℃水浴条件下, 用反应浓度均为 1 mg/mL 的蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶分别处理抗菌肽粗提液 30 min, 测定各种酶处理液的抑菌活性, 每个处理设 3 次重复, 以不加酶处理的抗菌肽粗提液作为对照, 将对照的抑菌活性定为 100%。

1.2.6 凝血试验 取加抗凝剂的兔全血 1 mL 至于 10 mL 离心管中, 同时向离心管中加入 4 mL 的生理盐水, 3 000 r/min 离心 3 min, 离心洗涤 3 次后, 沉淀至于 1.5 mL 的 Eppendorf (EP) 管, 按压积红细胞体积加生理盐水配成 2%兔血细胞液。取浓度为 2%的血细胞 100 μ L 滴加到 24 孔 U 形板中, 再加入 50 μ L 黄粉虫抗菌肽粗提液, 静置一段时间, 观察血细胞凝集现象, 以麦胚凝集素为阳性对照。

1.2.7 数据处理 采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 的独立样本 *t*-检验和 One-way ANOVA 程序进行数据的差异性检验。

2 结果与分析

2.1 黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度的测定结果

大肠杆菌诱导黄粉虫 12、24、36、48、60 和 72 h 后, 依据抗菌肽粗提液吸光度值 (*OD*₅₉₅) 及标准曲线, 确定诱导不同时间的黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度 (表 1)。

表 1 的测定结果显示, 对照组 (未诱导) 的

黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度在 12、24、36、48、60 和 72 h 比较稳定, 维持在 0.913 mg/mL 左右。而用大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽粗提液蛋白浓度在不同时间内, 均极显著的高于对照组 ($P<0.01$), 在 48 h 内, 随着诱导时间的延长抗菌肽粗提液蛋白浓度逐渐升高, 且在 48 h 时达到最大值, 之后随着诱导时间延长黄粉虫抗菌肽粗提液浓度趋于下降。

2.2 黄粉虫抗菌肽粗提液对大肠杆菌抑菌活性的测定结果

表 1 的测定结果显示, 大肠杆菌诱导黄粉虫 48 h 时产生的抗菌肽浓度最高, 因此, 对诱导 48 h 的黄粉虫抗菌肽和抗生素对大肠杆菌进行了抑菌活性测定 (表 2)。

表 2 的测定结果显示, 大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽产生的抑菌圈直径为 23.57 mm, 显著高于对照组 (未诱导的黄粉虫组) ($P<0.05$), 但低于抗生素组 ($P<0.05$)。

2.3 黄粉虫抗菌肽粗提液的部分生化特性测定结果

2.3.1 热稳定性 大肠杆菌诱导黄粉虫抗菌肽粗提液经不同温度处理 10 min 后, 进行抑菌差异性分析。温度在 50~70℃处理的黄粉虫抗菌肽与对照组差异不显著 ($P>0.05$), 抑菌率在 98% 以上; 80℃处理的黄粉虫抗菌肽与对照

表 1 大肠杆菌诱导黄粉虫幼虫抗菌肽粗提液蛋白浓度测定 (mg/mL)
Table 1 Protein concentration assay of antimicrobial peptide extracted from *Tenebrio molitor* larvae induced by *Escherichia coli* (mg/mL)

组别 Group	诱导后时间 Time after induction (h)					
	12	24	36	48	60	72
对照组 Control group	0.913±0.006B	0.913±0.002B	0.908±0.003B	0.911±0.004B	0.916±0.002B	0.914±0.003B
大肠杆菌 诱导组 Induction group	1.026±0.006A	1.247±0.006A	1.427±0.018A	1.533±0.003A	1.425±0.004A	1.247±0.003A

表中数据均为平均值±标准误, 同列数据后不同大写字母表示经 SPSS 17.0 独立样本 *t*-检验分析差异极显著 ($P<0.01$)。The data in the table are mean ± SE, and followed by different capital letters in the same column indicate extremely significant different at 0.01 level by *t*-test.

表 2 黄粉虫幼虫抗菌肽对大肠杆菌的抑菌圈直径的测定结果

Table 2 The antibacterial circle diameter produced by the AMPS extracted from *Tenebrio molitor* larvae induced by *Escherichia coli*

组别 Group	抑菌圈直径 (mm) Diameter of antibacterial circle (mm)
大肠杆菌诱导黄粉虫产生的抗菌肽组 Induction group	23.57±0.72b
抗生素组 Antibiotic group	26.04±0.14a
对照组 (未诱导的黄粉虫) Control group	17.51±0.43c

表中数据均为平均值±标准误, 同列数据后标有不同小写字母分别表示经 SPSS 17.0 One-Way ANOVA 程序分析差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

The data in the table are mean ± SE, and followed by different small letters in the same column indicate significant different at 0.05 level (One-way ANOVA procedure of SPSS 17.0). The same below.

表 3 黄粉虫幼虫抗菌肽经不同温度处理后的抑菌活性
Table 3 Antibacterial activity of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* larvae heated at different temperature

温度 (°C) Temperature	抑菌圈直径 (mm) Diameter of antibacterial circle	抑菌率 (%) Rate of bacteriostasis
50	22.39±0.4627a	99.20
60	22.53±0.6677a	100.00
70	22.14±0.3474a	98.09
80	20.18±0.5097b	89.41
90	18.90±0.4253c	83.73
100	17.95±0.3056c	79.53
对照 CK	22.57±0.1214a	100.00

组 (未经热处理) 差异显著 ($P<0.05$) , 但其抑菌率仍然可以达到 89.47% , 此结果提示, 50~80°C 的范围对抗菌肽的抑菌效果没有影响。当温度达到 90~100°C 时, 黄粉虫抗菌肽的抑菌活性显著降低和对照组差异显著 ($P<0.05$) , 结果提示, 90°C 后, 再继续升高温度就影响了黄粉虫抗菌肽的活性。但抑菌率仍然保持在 80% 左右, 因此, 抗菌肽具有较好的热稳定性。

2.3.2 反复冻融性 将大肠杆菌诱导的黄粉虫抗菌肽粗提液在 -20°C 冰箱中分别反复冻融 1、2、4、6、8 和 10 次后, EP 管底部出现一些沉淀, 用离心机离心后取上清液, 对其进行抑菌活性差异性分析。结果表明, 经冻融后的抗菌肽产生的抑菌圈直径均有一定程度的减小。冻溶 6 次以内的抗菌肽与对照组 (未经冻溶) 差异不显著 ($P>0.05$) , 其抑菌率在 89% 以上, 冻溶 8~10 次的抗菌肽与对照组存在显著差异 ($P<0.05$) , 并且冻融第 8 次和第 10 次的抗菌肽之间也存在着显著性差异。随着冻溶次数的增多, 黄粉虫抗菌肽的抑菌活性逐渐下降, 但其抑菌率仍在 84% 以上。可见, 少数的反复冻溶不会对黄粉虫抗菌肽的活性产生较大的影响, 但随着冻融次数的增加可能对其活性产生较大的影响。

表 4 不同冻融次数对黄粉虫幼虫抗菌肽抑菌活性的影响

Table 4 Effect of times of freezing and dissolving on antibacterial activity of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* larvae

冻融次数 Times of freezing and dissolving	抑菌圈直径 (mm) Diameter of antibacterial circle	抑菌率 (%) Rate of bacteriostasis
1	21.59±0.2949a	96.59
2	21.25±0.1673a	95.07
4	20.05±0.2153a	89.71
6	19.95±0.3088a	89.26
8	19.32±0.2735b	86.44
10	18.83±0.4208c	84.25
对照 CK	22.35±0.1615a	100.00

2.3.3 pH 稳定性 将大肠杆菌诱导的黄粉虫幼虫抗菌肽粗提液经不同浓度的 pH 溶液处理, 抗菌肽抑菌活性有一定程度的下降, 但均不能造成其抗菌活性的完全丧失, 可见其具有一定的抗酸碱性能。在 pH 值为 3.0~7.0 条件下, 抗菌肽具有较强的抑菌活性, 抑菌率在 70% 以上, 且在 pH=5 时抑菌活性最大, 抑菌率为 98.81% , 而在 pH<3 或 pH>9 的环境条件下抑菌活性会受到很大影响或不表现活性, 抑菌率均低于 50%。因

此, 过酸或过碱均能影响抗菌肽的抑菌活性。

表 5 不同 pH 溶液对黄粉虫幼虫抗菌肽抑菌活性的影响

Table 5 Effect of different pH values on antibacterial activity of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* larvae

pH 值 pH values	抑菌圈直径 (mm) Diameter of antibacterial circle	抑菌率 (%) Rate of bacteriostasis
1	8.74±0.2714d	47.47
3	13.67±0.2184c	74.25
5	18.19±0.3118a	98.81
7	15.72±0.2111b	85.39
9	11.77±0.1360c	63.93
11	9.20±0.1350d	49.97
对照 CK	18.41±0.2478a	100.00

2.3.4 蛋白酶稳定性 对大肠杆菌诱导的黄粉虫幼虫抗菌肽粗提液又进行了蛋白酶稳定性的测定 (表 6), 结果显示, 黄粉虫抗菌肽经过胰蛋白酶和胃蛋白酶作用处理后, 抑菌活性显著低于对照组 ($P<0.05$), 但保持着理想的抑菌活性, 其抑菌率比对照组分别下降 25.97%和 37.07%; 经蛋白酶K 作用后, 黄粉虫幼虫抗菌肽与对照组差异不显著, 仅下降 1.98%, 表明蛋白酶 K 对抗菌肽的抑菌活力没有影响, 但对胰蛋白酶和胃蛋白酶的作用敏感。

表 6 蛋白酶对黄粉虫幼虫抗菌肽抑菌活性的影响

Table 6 Effect of proteinase on antibacterial activity of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* larvae

酶 Proteinase	抑菌圈直径 (mm) Diameter of antibacterial circle	抑菌率 (%) Rate of bacteriostasis
胰蛋白酶 Trypsin	14.06±0.1533c	74.03
胃蛋白酶 Pepsin	11.95±0.4083c	62.93
蛋白酶 K Proteinase K	18.63±0.4419ab	98.11
对照 CK	18.99±0.1332a	100.00

2.4 凝血活性检测 将浓度为 2%的血细胞 100 μL 滴加到 24 孔 U 形板中, 再加入 50 μL 黄粉虫

抗菌肽粗提液, 静置 2~3 min 后, 观察到抗菌肽对家兔的红细胞没有凝集作用, 血球沉于孔底部成一小圆点, 上层液透明, 未见溶血现象, 而作为凝集阳性对照的麦胚凝集素使家兔红细胞相互聚集形成一片网络状, 实验结果表明, 黄粉虫抗菌肽对兔血无凝集效应。

3 讨论

昆虫为适应各种不同的生存环境, 形成了独特的免疫系统, 常被人工或自然诱导产生抗菌肽、抗菌蛋白等免疫因子 (Hoffmann *et al.*, 1999; 赵卓等, 2008)。抗菌肽是一类短肽物质, 具有抗菌、抗原虫、抗病毒、抗真菌和抑制或杀伤肿瘤细胞等作用 (Hancock, 2001; Koczulla and Bals, 2003)。对于抗菌肽的表达, 相关研究报道抗菌肽的表达是在微生物诱导后产生并且持久表达的非专一性的免疫应答产物, 不同的诱导源作用都能在昆虫血淋巴中检测到相同的抗菌肽, 并且认为抗菌肽是直接合成的, 不是从已存在的前体加工而来的 (Johnston *et al.*, 2014)。但随着研究的深入, 人们发现在昆虫机体中存在抗菌肽的前体 (程廷才等, 2004), 且抗菌肽基因表达调控机制也比较复杂, 不同种类的微生物能特异地激活特定的抗菌肽基因表达。从而表现为在不同诱导源刺激下, 昆虫机体会诱导产生不同的抗菌肽, 同时产生的抗菌肽的抑菌强度也不同 (刘建涛等, 2006)。与革兰氏阳性细菌相比, 革兰氏阴性细菌具有更强的诱导效应, 这是因为脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 即内毒素, 作为革兰阴性菌细胞壁中的组分, 是革兰阴性菌作用于昆虫后引起免疫反应的生物学活性部分, 同样也是昆虫抗菌蛋白产生的有效刺激诱导源 (Zhao *et al.*, 2010)。另外, 还有研究报道, 天蚕素 (Cecropins) A、B、D 是应对细菌感染时表达的包含 35~37 个氨基酸的肽, cDNA 克隆显示天蚕素作为一种前蛋白原, 需要经历四个阶段才能成为成熟肽, Cecropins 基因 A、B、D 活动时间并非同步, A 和 B 基因的转录在感染细菌后 2 h 出现, 48 h 后达到峰值, 此后数天持续高

表达, D 基因则延后 48~96 h 出现反应, 而 114 h 后达到表达高峰。与以上结果相对应, 感染后 10~24 h 血淋巴中可以检测到成熟的抗菌肽 A 和 B, 而 48 h 后才能检测到抗菌肽 D (Gudmundsson *et al.*, 1991)。在蛋白质水平上的研究发现, 家蝇 *Musca domestica* 幼虫经诱导后产生的抗菌蛋白抗菌谱广, 不同诱导源可诱导家蝇幼虫产生相同蛋白及不同的新蛋白但产生的高峰时间不同, 产生抗菌蛋白达最大活性时间为诱导后 36~48 h (刘晖等, 2006)。因此本研究中用革兰氏阴性菌大肠杆菌诱导黄粉虫 12、24、36、48、60 和 72 h, 根据诱导不同时间测定产生抗菌肽的量, 表明大肠杆菌能使黄粉虫作为一种应答反应而产生一系列抗菌物质, 并且黄粉虫被诱导不同时间所产生抗菌肽的量也不同, 在诱导前期产生的抗菌肽量持续增加, 至 48 h 时达到最大值, 与多数学者的研究报道抗菌肽的诱导表达活性在 48 h 时活性最高相一致 (Haine *et al.*, 2008)。随着诱导时间继续增加, 抗菌肽的浓度逐渐降低, 可能是大肠杆菌菌液在黄粉虫体内刺激抗菌肽的表达是一个渐进的过程, 当体内的感染得到控制后, 抗菌肽的表达量便维持在一个稳定的水平, 具体机制有待于进一步研究。

一般认为, 一些外源物质如细菌、理化因素等均能诱导昆虫产生抗菌物质、溶菌酶和凝集素等物质, 但诱导产物的活性强弱与组分比例有一定的差异, 这些组分的不同就表现在抗菌性能上有所不同 (Li *et al.*, 2012)。研究表明不同微生物诱导产生的昆虫抗菌肽具有广谱抑菌性, 且诱导表达样品对于相应的诱导菌均表现很高的抗菌活性, 同时发现各种抗菌肽样品毛细管 (Capillary electrophoresis CE) 电泳蛋白谱具有明显不同 (刘建涛等, 2006; 翟培等, 2006)。因此本研究采用大肠杆菌刺激 48 h 的黄粉虫诱导产生的抗菌肽提取物进行抑菌效果测定, 结果显示大肠杆菌诱导组的黄粉虫产生的抗菌肽对大肠杆菌有较强的抑制作用, 抑菌活性显著高于未诱导的对照组 ($P < 0.05$), 低于抗生素组 ($P < 0.05$)。

随着抗菌肽一系列功能活性的不断发现, 以及各种技术水平的稳步提高, 对其构效关系的研究也日益深入。一些直接影响抗菌肽功能活性的理化性质也开始受到关注。研究发现, 连接有 Zn^{2+} 的阴性肽复合体及高电荷阳性肽, 比中性肽或低电荷肽的抗菌效能更高 (Brogden, 2005), 另一项重要参数是抗菌肽的疏水性。有关实验证明, 当疏水性增加时, 其抗菌活性也逐渐升高; 但当疏水性达到一定程度时, 该肽段将丧失对真核细胞与原核细胞之间的选择性, 继而对真核生物也产生毒性 (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998)。而本实验对黄粉虫抗菌肽的理化特性进行了研究, 结果表明, 温度为 50~80°C 的范围对抗菌肽活性无明显影响, 其抑菌活性能保持在 95% 左右; 继续升高温度, 其活性有所下降, 但维持在 80% 左右, 表明黄粉虫抗菌肽对热不敏感, 与大多数抗菌肽耐热 (Urich *et al.*, 1997; 国果等, 2006) 的特征相符, 表明抗菌肽在水溶性环境内没有稳定的构象, 只是在结合上或接近细胞膜时才形成其发挥功能的高级结构, 这可能是抗菌肽具有很高的热稳定性的原因。反复冻溶的结果表明, 反复冻溶 6 次以内, 抑菌率仍能保持在 89% 以上, 提示其具有耐冻溶性和耐低温保存性。另据报道, 多数昆虫抗菌肽是碱性的, 其等电点应该大于 7 (Andersons, 1991; Fehlbaum *et al.*, 1996), 本实验的测定结果表明, pH 值为 3.0~7.0 的条件下, 黄粉虫抗菌肽具有较强的抑菌活性, 抑菌率在 70% 以上, 且在 pH=5 时抑菌率抑菌活性最大, 抑菌率达 98.81%, 表明其具有较强的耐酸碱性。蛋白酶稳定性的测定结果显示, 胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解不能使黄粉虫抗菌肽活性完全丧失, 而经蛋白酶 K 处理后其抑菌率仍能达到 98%, 说明在外界环境中具有较强的酶稳定性。凝集素是昆虫防御机制的组成部分之一, 分子量较大, 其作用是凝集外来的微生物, 并介导血细胞对其包被和吞噬 (Cornet *et al.*, 1995)。凝血试验结果表明黄粉虫抗菌肽对兔血无凝集效应, 所以排除黄粉虫抗菌肽中凝集素对红细胞凝集的可能。通过对黄粉虫抗菌物质诱导表达以

及部分生化性质及凝血活性的研究结果表明, 黄粉虫抗菌肽生物学性质稳定、抑菌效果好, 具有开发利用价值和 market 应用前景, 而对于黄粉虫抗菌肽的结构、功能以及抗菌机理还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Andersons D, Engstrom A, Josephson S, Hansson L, Steiner H, 1991. Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A. *Biochem. J.*, 280(Pt1): 219–224.
- Auvynet C, Rosenstein Y, 2009. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big player in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal*, 276(22): 6497–6508.
- Brogden KA, 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3): 238–250.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4/5): 329–344.
- Chen GN, Xia XJ, Long YH, Li JR, Wu JJ, Zhu Y, 2014. Research progresses and applications of antimicrobial peptides. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 26(1): 17–25. [陈冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 李姣蓉, 武靖洁, 朱勇, 2014. 抗菌肽研究进展及其应用. *动物营养学报*, 26(1): 17–25.]
- Chen TC, Wang GH, Li J, Xia QY, 2004. The regulatory mechanism of expressing insect antimicrobial peptides. *Newsletter of Sericultural Science*, 2(3): 20–26. [程廷才, 王根洪, 李娟, 夏庆友, 2004. 昆虫抗菌肽基因表达调控机理. *蚕学通讯*, 2(3): 20–26.]
- Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F, 1995. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A in water from NMR data. *Structure*, 3(5): 435–448.
- Fan HY, Liu YG, Zhao RJ, Qiao CJ, Shen JY, 2011. Effect of the antimicrobial peptide of *Tenebrio molitor* L. on mitochondrial membrane potential and caspase-3 of K563 cells. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 18(1): 38–41. [樊宏英, 刘颜岗, 赵瑞君, 乔丛静, 申金雁, 2011. 黄粉虫抗菌肽促 K562 细胞凋亡作用及其机制的研究. *寄生虫与医学昆虫学报*, 18(1): 38–41.]
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA, 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(3): 1221–1225.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P, 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47(6): 479–491.
- Gudmundsson GH, Lidholm DA, Asling B, Gan R, Boman HG, 1991. The cecropin locus cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J. Biol. Chem.*, 266(18): 11510–11517.
- Guo G, Wu JW, Fu P, Zhang Y, Song YZ, Song ZK, 2006. Biochemical characteristics of the antibacterial peptides in secretion of *Musca domestica* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 49(6): 918–923. [国果, 吴建伟, 付萍, 张勇, 宋玉竹, 宋智魁, 2006. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽的生化特性初步研究. *昆虫学报*, 49(6): 918–923.]
- Han RL, Sun QL, Erdongfu, LI LM, 1998. Studies on induction and activity of antibacterial peptides in the larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Inner Mongolia Institute of Agriculture & Animal Husbandry*, 19(3): 114–117. [韩润林, 孙庆林, 额尔敦夫, 李立民, 1998. 黄粉虫幼虫中抗菌肽的诱导及其抗菌活性的初步研究. *内蒙古农牧学院学报*, 19(3): 114–117.]
- Hancock RE, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16(2): 82–88.
- Hancock RE, 2001. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.*, 1(3): 156–164.
- Haine ER, Pollitt LC, Moret Y, Siva-Jothy MY, Rolff J, 2008. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *J. Insect Physiol.*, 54(6): 1090–1097.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418): 1313–1318.
- Huang XQ, Gao XP, Zhao GM, Li MY, Liu YX, Zhang QH, Sun LX, Yuan YJ, 1998. Review of bacteriostasis mechanisms of antimicrobial peptides. *Journal of biology*, 27(2): 62–66. [黄现青, 高晓平, 赵改名, 李苗云, 柳艳霞, 张秋会, 孙灵霞, 袁勇军, 2010. 抗菌肽抑菌机制研究进展. *生物学杂志*, 27(2): 62–66.]
- Johnston PR, Makarova O, Rolff J, 2014. Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *Genetics of immunity*, 4 (6): 947–955.
- Koczulla AR, Bals R, 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs*, 63(4): 389–460.
- Lee KH, Hong SY, Oh JE, Kwon MY, Yoon JH, Lee JH, Lee BL, Moon HM, 1998. Identification and characterization of the antimicrobial peptide corresponding to C-terminal β -sheet domain of tenecin 1, an antibacterial protein of larvae of *Tenebrio molitor*. *Biochem. J.*, 334 (1): 99–105.
- Liu H, Wan QH, He LF, Zhang X, 2006. Study on inducement and antibacterial characterization of antibacterial proteins in *Musca domestica* larvae. *China Public Health*, 22(5): 568–569. [刘晖, 万启惠, 贺莉芳, 张曦, 2006. 家蝇幼虫抗菌蛋白的诱导及抗菌特性. *中国公共卫生*, 22(5): 568–569.]
- Liu JT, Si ZJ, Wang FH, Li GH, Song SY, 2006. Progresses on insect antimicrobial peptides. *Natural Enemies of Insects*, 28(1): 1–5.

- 36–42.[刘建涛, 苏志坚, 王方海, 李广宏, 宋少云, 2006. 昆虫抗菌肽的研究进展. *昆虫天敌*, 28(1): 36–42.]
- Liu YG, Cheng JX, Zhao RJ, Fan HY, 2009. Isolation and purification of antibacterial peptides with anti-K562 activity from the *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 20(6): 565–568.[刘颜岗, 程璟侠, 赵君瑞, 2009. 黄粉虫幼虫抗肿瘤细胞 K562 抗菌肽的分离纯化. *中国媒介生物学及控制杂志*, 20(6): 565–568.]
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z, 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2): 207–215.
- Moon HJ, Lee SY, Kurata S, Natori S, Lee BL, 1994. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J. Biochem.*, 116(1): 53–58.
- Orsolya T, 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, 80 (6): 717–735.
- Rahnamaeian M, Langen G, Imani J, Khalifa W, Altincicek B, Wettstein DV, Kogel KH, Shin S, Kim JK, Lee JY, Jung KW, Hwang JS, Lee DG, Kim I, Shin SY, Kim Y, 2009. Design of potent 9-mer antimicrobial peptide analogs of protaetiamycine and investigation of mechanism of antimicrobial action. *J. Pept. Sci.*, 15(9): 559–568.
- Ruan HB, 2012. Induction, antibacterial activity, separation and purification of antimicrobial peptides of *Tenebrio molitor*. Mater Dissertation. Yaan: Sichuan Agricultural University.[阮华波, 2012. 黄粉虫抗菌肽的诱导、抑菌作用及其分离纯化. 硕士论文. 雅安: 四川农业大学.]
- Shin S, Kim JK, Lee JY, Jung KW, Hwang JS, Lee DG, Kim I, Shin SY, Kim Y, 2009. Design of potent 9-mer antimicrobial peptide analogs of protaetiamycine and investigation of mechanism of antimicrobial action. *J. Pept. Sci.*, 15(9): 559–568.
- Sun L, Feng Y, He Zhao, Chen ZY, Zhao M, 2012. Isolation and purification of small antimicrobial peptide from larvae of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 686–692.[孙龙, 冯颖, 何钊, 陈智勇, 赵敏, 2012. 黄粉虫幼虫小分子量抗菌肽的分离纯化. *应用昆虫学报*, 49(3): 686–692.]
- Tang X, Mao XF, Kelaimu REXILI, Liu ZY, 2011. High-level expression and function assay of antimicrobial peptide TmAMP3 of *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae, Coleoptera) in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(10): 1111–1117.[唐馨, 毛新芳, 热西历·克来木, 刘忠渊, 2011. 黄粉虫抗菌肽 TmAMP3 在大肠杆菌中的高效表达及活性检测. *昆虫学报*, 54(10): 1111–1117.]
- Tao SX, Han JF, Li Y, 2009. biological properties and preliminary purification of antibacterial peptide from *Tenebrio molitor*. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 37(29): 14167–14170.[陶淑霞, 韩静菲, 李玉, 2009. 黄粉虫抗菌肽的生物学性质及初步分离纯化. *安徽农业科学*, 37(29): 14167–14170.]
- Ulrich HE, Hansmann MM, Okamoto Y, 1997. Characteristic temperatures of folding of a small peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (20): 10652–10656.
- Wang LX, Zhang BW, Dai SF, 2008. Inducement characteristics and electrophoresis pattern of antibacterial peptide in larva of *Tenebrio molitor* L. *Anhui Agricultural Science Bull.*, 24(21): 43–46.[王立新, 张伯卫, 戴四发, 2008. 黄粉虫幼虫抗菌肽的诱导特性及电泳组分研究初报. *安徽农学通报*, 24(21): 43–46.]
- Wang XP, Xu GJ, Wang ZX, 2000. The kinetics of inducible antibacterial substance from yellow mealworm(*Tenebrio molitor*). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 19(3): 223–226. [王小平, 徐冠军, 汪钟信, 2000. 大肠杆菌对黄粉虫不同虫态诱导动力学的研究. *华中农业大学学报*, 19(3): 223–226.]
- Wu TT, Yang J, 2009. Progress in investigation of natural antimicrobial peptides and application prospect. *Biotechnology Bulletin*, (1): 27–30.[吴甜甜, 杨洁, 2009. 天然抗菌肽的研究进展及应用前景. *生物技术通报*, (1): 27–30.]
- Xiao MZ, Jin XB, Zhu JY, 2010. Antioxidant mechanism and application prospective of antibacterial peptides. *Food Science*, 31(11): 312–315.[肖明珠, 金小宝, 朱家勇, 2010. 抗菌肽抗氧化作用机制及其应用前景. *食品科学*, 31(11): 312–315.]
- Zhai P, Hou LX, Le GW, Shi YH, Han JH, Dai H, 2006. The characteristics of the antibacterial peptides of *Musca domestica* larvae induced by various microorganisms. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 25(5): 41–45.[翟培, 侯丽霞, 乐国伟, 施用晖, 韩晋辉, 代卉, 2006. 不同微生物诱导家蝇幼虫表达抗菌肽的特性. *食品与生物技术学报*, 25(5): 41–45.]
- Zaslloff M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870): 389–395.
- Zhao Z, Hao XL, Li N, Ren BZ, 2008. The dynamic development of spermary and ovary of six species of dominant locusts in Siping Area of Jilin Province, China. *Journal of Jilin Agricultural University*, 30(5): 677–681.[赵卓, 郝锡联, 任炳忠, 2008. 四平地区 6 种优势蝗虫精巢和卵巢发育动态. *吉林农业大学学报*, 30(5): 677–681.]
- Zhao PS, Jing N, Zhang AZ, 2010. Cloning and bioinformatic analysis of antibacterial peptide gene Cec Md from *Musca domestica* larvae challenged by lipopolysaccharide (LPS) and construction of its recombinant expression vector. *Chin. J. Vet. Sci. Jan.*, 30(1): 74–81.
- Zimmerman LB, Worley BV, Palermo EF, Brender JR, Lee KD, Kuroda K, Ramamoorthy A, Meyerhoff ME, 2011. Absorbance-based assay for membrane disruption by antimicrobial peptides and synthetic copolymers using pyrroloquinoline quinone-loaded liposomes. *Analytical Biochemistry*, 411(2): 194–199.