

唐 梅, 龚明福, 罗 燕, 等. 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌内生细菌 KLXD06 粗蛋白的提取[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 334–335.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.109

抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌内生细菌 KLXD06 粗蛋白的提取

唐 梅¹, 龚明福¹, 罗 燕², 管芩澜¹

(1. 乐山师范学院生命科学学院/峨眉山特色生物资源重点实验室, 四川乐山 614000; 2. 乐山师范学院工会, 四川乐山 614000)

摘要:雪胆具有多种药用价值, 菌株 KLXD06 是从雪胆中分离筛选的 1 株对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 具有抗菌活性的内生细菌。采用硫酸铵盐沉淀法提取 KLXD06 产生的抑菌粗蛋白, 结果表明, 用硫酸铵盐沉淀法能提取 KLXD06 发酵液的抑菌粗蛋白, 抑菌粗蛋白对 MRSA 的抗性较强, 并具有一定的热稳定性。

关键词:雪胆; 内生细菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 抑菌粗蛋白; 提取; 抗菌性; 热稳定性

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0334-02

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是医院内感染率极高的多重耐药性病原菌^[1-2], 仅对万古霉素敏感^[3], 医源性 MRSA 感染性疾病与乙型肝炎 (HBV)、艾滋病 (AIDS) 并列为世界范围内三大最难解决的感染性疾病^[4]。我国对药用植物抗金黄色葡萄球菌等感染进行过一系列研究^[5], 但是针对 MRSA 的研究较少, 近几年 MRSA 才得到关注^[6]。

雪胆 (*Hemsleya sinensis* Cogn.) 为葫芦科雪胆属植物, 不但对多种病原菌具有抗菌作用^[7], 还有多种药理功效^[8-10], 因而应用广泛^[11]。生活在雪胆组织中的内生细菌能产生与雪胆相似的活性成分。笔者课题组从雪胆中分离筛选到多株具有抗 MRSA 活性的内生细菌菌株^[12], 其中菌株 KLXD06 抗 MRSA 活性极强。本研究采用硫酸铵沉淀法提取 KLXD06 发酵液中的粗蛋白, 并检测其对 MRSA 的抑菌活性, 旨在为进一步开展雪胆内生细菌抗菌活性物质成分和功能研究以及抗 MRSA 新药研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

KLXD06 为笔者课题组分离保存的具有抗 MRSA 活性的雪胆内生细菌, 经常规鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。MRSA 由峨眉山特色生物资源重点实验室提供。

1.2 KLXD06 抑菌蛋白提取及抑菌活性测定

1.2.1 KLXD06 抑菌蛋白的提取 将活化的 KLXD06 按接种量 7% 接入无菌发酵培养基中, 该培养基为牛肉膏蛋白胨酵母培养基 (BPY): 牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化

钠 5 g、葡萄糖 5 g、蒸馏水 1 L, 调节 pH 值 7.0~7.2。37℃、140 r/min 振荡培养 3~4 d, 4 000 r/min 离心 15 min 后弃沉淀, 上清液经细菌过滤器 ($\Phi=0.22\ \mu\text{m}$) 过滤, 将滤液缓慢地加入饱和硫酸铵溶液至饱和度达到 60% 左右放置过夜, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值为 6.8) 溶解沉淀, 溶解液置 -20℃ 保存备用。

1.2.2 抑菌粗蛋白对 MRSA 的活性测定 在直径为 9 cm 的 NA 平板中涂布接种 0.1 mL 活化好的 MRSA 病原细菌悬液, 在平板上等距离打 4 个直径为 6 mm 的孔洞, 用已灭菌的 100 μL 移液枪向其中加入浓度分别为 20%、60%、100% 的粗蛋白溶解液 100 μL 。每个处理加入等量无菌水作为对照, 37℃ 黑暗培养 1~3 d。每个处理重复 3 次。用“十”字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.3 抑菌粗蛋白热稳定性测定 取拮抗效果明显的 1 组粗提蛋白溶解液, 分别在 40、60、80、100℃ 水浴处理 15 min 和 121℃ 加热处理 30 min 后, 按上述方法测定其对病原菌 MRSA 的抑菌圈直径。以未经热处理的原液代替处理液为对照, 每个处理重复 3 次。用粗蛋白的剩余抑菌活性表示抑菌粗蛋白的热稳定性。

剩余抑菌活性 = (处理液产生的抑菌圈直径/未处理原液产生的抑菌圈直径) \times 100%。

2 结果与分析

2.1 KLXD06 抑菌粗蛋白对 MRSA 的抗菌活性

对经硫酸铵盐析沉淀法得到的抑菌粗蛋白溶解液进行抑菌性试验。由表 1 可见, KLXD06 抑菌粗蛋白对 MRSA 的抑菌活性明显, 100% KLXD06 粗蛋白提取液对 MRSA 的拮抗效果较为明显, 在 0.05 水平上与 20%、60% KLXD06 粗蛋白的抑菌效果有显著差异。该处理下平均抑菌圈直径达到 13.7 mm, 具有作为抗 MRSA 药物开发的潜力。

2.2 KLXD06 抑菌粗蛋白的热稳定性

由图 1 可见, KLXD06 菌株产生的抑菌粗蛋白在 40、60、80、100℃ 水浴处理 15 min 和 121℃ 加热处理 30 min 后, 仍保

收稿日期: 2014-03-28

基金项目: 乐山师范学院科研项目 (编号: Z1160)。

作者简介: 唐 梅 (1971—), 女, 重庆人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: 764301686@qq.com。

通信作者: 龚明福, 博士, 教授, 主要从事微生物资源及微生物与植物间相互关系研究。E-mail: gongmingfu98@163.com。

表 1 不同浓度 KLXD06 抑菌粗蛋白对 MRSA 的作用

粗蛋白浓度 (%)	抑菌圈直径(mm)				显著性
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值 ± 标准差	
20	12.6	10.2	11.4	11.4 ± 1.2	bA
60	11.7	12.2	11.5	11.8 ± 0.4	bA
100	13.5	13.2	14.3	13.7 ± 0.6	aA
0(无菌水)	-	-	-	-	

注：“-”代表没有抑菌活性；不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

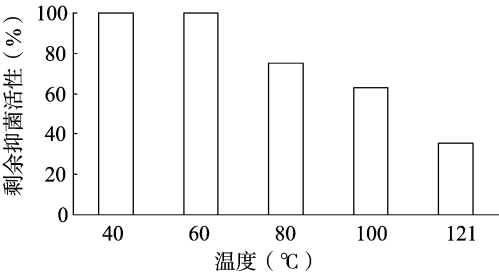


图1 温度对 KLXD06 抑菌粗蛋白活性的影响

持一定的抑菌活性。40、60℃处理 15 min 后,剩余抑菌活性与对照保持一致,仍然保持 100%的抑菌活性;80、100℃处理 15 min 后,剩余抑菌活性分别降为 75.0%、63.0%;121℃处理 30 min 后,剩余抑菌活性仍保留 35.5%。表明 KLXD06 抑菌粗蛋白具有一定的热稳定性,可耐受 121℃及以下的温度。

3 结论与讨论

测定不同浓度雪胆内生细菌 KLXD06 抑菌粗蛋白对致病微生物 MRSA 的抑菌活性,结果表明 KLXD06 能分泌产生具有较高抗菌活性的产物。目前我国主要从黄芩、黄连等中草药及其提取物中筛选抗 MRSA 的物质^[13-15],但中草药成分复杂,其抑菌机制较难分析。刘佳等从土壤细菌中筛选到 1 株对 MRSA 有较好抑菌活性的芽孢杆菌^[16];黄惠琴等从海洋微生物中筛选到 1 株抗 MRSA 的海洋放线菌^[17];张守村等从苦豆子内生细菌中筛选到 1 株抗 MRSA 活性较强的菌株,并提取到 1 种抗 MRSA 的活性成分^[18]。从其他药用植物内生细菌中筛选抗 MRSA 菌株的研究还鲜见报道,对内生细菌抗 MRSA 成分的分析更少。

KLXD06 产生的抗菌物质可以通过硫酸铵盐析沉淀法分离得到,并对热稳定,本研究初步认定其抗菌活性物质的主要成分为蛋白质类物质,但究竟是什么物质,结构及性质如何,是否存在其他抑菌物质,抑菌物质产生条件等问题还有待深入

探讨。

参考文献:

[1] 张小青,易婷,林春婵,等. 医院感染现患率调查与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(12):1352-1354.

[2] Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Medical Microbiology,2002,292(2):67-74.

[3] Linares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications[J]. Clinical Microbiology and Infection,2001,7(4):8-15.

[4] 马翔宇,易龙,宋治远. 医源性 MRSA 感染及其防治研究进展[J]. 临床医学,2003,23(5):53-54.

[5] 王嵩. 中草药抗细菌感染的研究[J]. 北京中医,2002,21(4):249-251.

[6] 肖丽英,黄焯坡. 23 种中草药对耐药金葡菌的敏感性探讨[J]. 时珍国医国药,2001,12(10):878-879.

[7] 李亮,朱玲,刘蓉,等. 雪胆素的药效学试验[J]. 四川生理科学杂志,2005,27(3):135.

[8] 陶朝阳,易杨华,林厚文,等. 雪胆根抗肿瘤活性成分研究[J]. 第二军医大学学报,1999,20(5):337-338.

[9] 刘艳丽,李笑然,范胤胤,等. 雪胆胃肠丸对胃溃疡的作用实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):301-302.

[10] 陈夏静,伍怡颖,匡文娟,等. 雪胆素片抗炎镇咳作用的实验研究[J]. 四川生理科学杂志,2009,31(4):153-154.

[11] 杨群芳,王贤英. 中药雪胆及其制剂的研究进展[J]. 中国药业,2003,12(9):76-77.

[12] 康琳,魏金莉,胡蝶,等. 雪胆中抗 MRSA 内生细菌的多样性[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):303-305.

[13] 汪雅萍,陈同钧. 十一种中草药对细菌的体外抑菌作用分析[J]. 上海医学检验杂志,1999,14(4):206-207.

[14] 杨明炜,陆付耳,徐丽君,等. 20 种清热解毒中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抑菌的初步观察[J]. 中国药师,2006,9(2):141-142.

[15] 左国营,王根春,徐贵丽,等. 30 种中草药提取物体外抗 MRSA 的筛选研究[J]. 中国现代应用药学,2006,23(4):293-295.

[16] 刘佳,谢秀丽,牛天贵. 一株抑耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报,2007,12(6):20-23.

[17] 黄惠琴,吕家森,张开山,等. 一株抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的海洋放线菌的鉴定及系统发育分析[J]. 中国海洋药物,2004,23(6):23-26.

[18] 张守村,韩松,黄晓艳,等. 一株抗 MRSA 内生细菌的鉴定及其活性物质[J]. 微生物学通报,2011,38(6):860-864.