

# 化学合成抗菌肽抑制致病性大肠杆菌 F41 的分子作用机理

谢海伟<sup>1</sup>, 杨贤松<sup>1</sup>, 柯春林<sup>1</sup>, 许晖<sup>1</sup>, 郭勇<sup>2</sup>

(1. 蚌埠学院生物与食品工程系, 安徽蚌埠 233030) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以化学合成抗菌肽为研究对象, 对合成抗菌肽的抑菌活力、抑菌动力学进行研究; 通过圆二色谱法评价抗菌肽二级结构的变化; 电镜观察抗菌肽对细菌微观结构影响;  $K^+$ 和紫外吸收物质泄漏实验分析抗菌肽对细胞膜通透性影响; DNA 凝胶阻滞实验分析抗菌肽与细菌 DNA 相互作用关系。结果表明: 不同抗菌肽的抑菌活力、抑菌动力学存在差异; 抑菌活力与抗菌肽浓度、作用时间有关; 抗菌肽 Tac、TacW、TacV 明显改变细胞微观结构, 使胞内  $K^+$ 和紫外吸收物质泄漏, 细胞膜通透性改变, 造成细胞坍塌破裂, 进入细胞与 DNA 结合, 产生凝胶阻滞现象。得出结论: 抗菌肽作用机理与抗菌肽结构中碱性氨基酸、两性氨基酸的比例密切相关, 其分子作用机理包括使细胞膜通透性发生变化、改变细菌细胞微观结构、结合基因组 DNA, 抑制复制、转录等, 形成多个作用靶点, 是一种多效协同的作用机制。

**关键词:** 合成肽类抗菌肽; 抑菌动力学; 通透性; 分子作用机理

文章编号: 1673-9078(2016)1-44-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.007

## Molecular Mechanisms of Novel Synthetic Analogs of Tachyplesin against Pathogenic *Escherichia coli* F41

XIE Hai-wei<sup>1</sup>, YANG Xian-song<sup>1</sup>, KE Chun-lin<sup>1</sup>, XU Hui<sup>1</sup>, GUO Yong<sup>2</sup>

(1. Department of Food and Bioengineering, Bengbu College, Bengbu 233030, China)

(2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the antibacterial activity and antibacterial kinetics of synthetic tachyplesins. The changes in the secondary structure of the synthetic peptides were investigated by circular dichroism (CD) spectroscopy, and the effect of synthetic peptides on the microstructure of cells was investigated by electron microscopy. The permeability of the cell membrane was investigated by leakages of  $K^+$  ion and ultraviolet (UV)-absorbing materials, and the interaction between synthetic peptides and genomic DNA was investigated by DNA gel retardation experiment. The results showed that the antibacterial activity and antibacterial kinetics were different in different synthetic tachyplesins, and the antibacterial activity was related with the concentration of tachyplesins and the action time. The cellular microstructure of *Escherichia coli* was significantly changed by synthetic antimicrobial peptides Tac, TacW, and TacV causing leakages of  $K^+$  ions and UV absorbing materials, changes in cell membrane permeability, bacterial cell wall fractures, and cell collapse. At the same time, synthetic antibacterial peptides could bind to genomic DNA and lead to gel retardation. In conclusion, the action mechanism of synthetic tachyplesins is closely related to the ratio of amphiphilic amino acids and basic amino acids in tachyplesins structure. The molecular mechanisms involves multiple effects, including changes in membrane permeability and bacterial cell microstructure, genomic DNA binding, inhibition of replication and transcription, and formation of multiple targets..

**Key words:** synthetic tachyplesins; antibacterial kinetics; permeability; molecular mechanisms

收稿日期: 2015-02-19

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目 (KJ2015A154); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2016362); 安徽省自然科学基金 (1208085QC60); 安徽省高校自然科学研究 (重大) 项目 (KJ2012ZD10); 安徽省大学生创新训练项目 (AH201311305079); 蚌埠学院学术技术带头人后备人选项目

作者简介: 谢海伟 (1978-), 男, 博士, 副教授, 主要从事酶工程及抗菌肽作用机理方面的研究

鲎素 (tachyplesin I) 是由Miyata T等<sup>[1]</sup>首次报道从中国鲎 (*horseshoe crab*) 血细胞小颗粒分离提取的一类抗菌肽, 具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化的生物活性, 是一类具有巨大应用价值的抗菌肽。但由于中国鲎自然资源的限制, 极大制约鲎素抗菌肽的推广和应用。目前人工合成短链多肽的技术已经成熟, 合成成本大大降低, 这为鲎素抗菌肽的广泛应用提供了一个途径。天然鲎素抗菌肽含有17个氨基酸, 相对分子质量为2.263 kD, 等电点pI为12.3均富含碱性氨基酸, 羧基末端均为 $\alpha$ -精氨酸酰胺, 一级结构为: NH<sub>2</sub>-K-W-C-F-R-V-C-Y-R-G-I-C-Y-R-R-C-R-CONH<sub>2</sub>, 分子中由第3个半胱氨酸残基 (C3) 和第16个半胱氨酸残基 (C16), 由第7个半胱氨酸残基 (C7) 和第12个半胱氨酸残基 (C12) 分别键合成两个二硫键, 形成其反平行的 $\beta$ -折叠的二级结构, 正确二硫键的形成, 直接影响鲎素的二级结构的形成和稳定<sup>[2]</sup>。本文设计合成多条鲎素抗菌肽的类似物, 分别用酸性氨基酸谷氨酸 (E), 碱性氨基酸赖氨酸 (K), 疏水性氨基酸色氨酸 (W), 极性脂肪族氨基酸丝氨酸 (S), 非极性脂肪族氨基酸缬氨酸 (V) 替换天然鲎素肽一级结构中的半胱氨酸 (C), 用来

研究天然抗菌肽中二硫键、正电性、负电性及疏水亲水性对抗菌机理的影响。本文通过研究合成抗菌肽抗菌活力随时间变化关系, 合成抗菌肽二级结构与抗菌活性的关系, 合成抗菌肽对细菌细胞膜通透性影响, 合成抗菌肽和基因组DNA作用关系, 来提示合成抗菌肽的分子作用机制, 通过和天然鲎素抗菌机理的比较研究, 为合成鲎素能够尽快在生产实践中得到应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

抗菌肽 Tac、TacW、TacK、TacE、TacV、TacS 由上海默悉生物科技有限公司合成, 其一级结构及性质根据 EXPASY 的 ProtParam 预测如表 1。实验菌株: 致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli* K88、F41)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 购于中国微生物研究所。

表 1 合成抗菌肽一级结构及性质

Table 1 Primary structures and properties of synthetic tachyplesins

peptide	Sequence	Purity	disulfide bond	Net charge	hydropathicity
Tac	NH <sub>2</sub> -KWCFRVCYRGICYRRCR-CONH <sub>2</sub>	>95%	2	+6	- 0.34
Tac W	NH <sub>2</sub> -KWWFRVWYRGIWYRRWR-CON <sub>2</sub>	>95%	0	+6	- 0.23
Tac E	NH <sub>2</sub> -KWEFRVEYRGIEYRRER-CONH <sub>2</sub>	>95%	0	+2	- 0.72
Tac K	NH <sub>2</sub> -KWKFRKKYRGKKYRRKR-CONH <sub>2</sub>	>95%	0	+8	- 0.51
Tac S	NH <sub>2</sub> -KWSFRKSYRGKSYRRSR-CONH <sub>2</sub>	>95%	0	+6	- 0.62
TacV	NH <sub>2</sub> -KWVFRVVYRGIVYRRVR-CONH <sub>2</sub>	>95%	0	+6	- 0.46

### 1.2 主要仪器设备

XL-30 环境扫描电子显微镜, 荷兰 PHILIPS 公司; J-810 圆二色谱仪, 日本 JASCO 公司; Z-5000 塞曼原子吸收分光光度计, 日本日立公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 圆二色谱测定

将设计合成抗菌肽 Tac、TacW、TacK、TacE、TacV、TacS 溶于 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 和 50% 三氟乙醇 (TFE), 至肽浓度为 0.1 mol/L。室温测定, 石英样品池的光程为 0.1 cm, 带宽 1.0 nm, 分辨率 0.5 nm, 扫描测定波长范围为 190-250 nm, 扫

描速度为 50 nm/min; 圆二色谱用平均残基摩尔椭圆度  $\theta$  表示。单位为: 度 $\times$ 厘米<sup>2</sup>/分摩尔 (deg cm<sup>2</sup>/dmol)。

#### 1.3.2 合成抗菌肽抗菌活力与抗菌动力学研究

具体参考 Lu Y.等<sup>[3]</sup>的方法, 通过双倍稀释法确定了合成抗菌肽的最小抑菌浓度 (MIC)。抗菌肽对大肠杆菌 F41 的抑菌动力学研究。参照 Cirioni O 等<sup>[4]</sup>的方法, 取对数生长期的大肠杆菌 F41, 用 LB 培养基配置 2.0 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL。加入 Tac、TacW、TacK、TacE、TacV、TacS 使其终浓度为各自最小抑菌浓度; 混合物 37 °C, 200 r/min 摇床培养, 分别在 10、20、40、60、80 min 取样, 稀释涂布 LB 固体, 37 °C 过夜培养, 计算菌落数。

#### 1.3.3 合成抗菌肽对细菌超微结构影响

### 1.3.3.1 扫描电镜观察

取对数生长期的大肠杆菌F41菌液, 5000 r/min离心, 收集菌体, 用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2次, 配置成 $2.0 \times 10^7$  CFU/mL菌悬液. 分别加入Tac、TacW、TacK、TacE、TacV、TacS, 使其达到最小抑菌浓度, 对照组添加灭菌生理盐水. 37 °C下孵育60 min, 离心收集菌体, 用无菌水洗涤2次, 加3%戊二醛-多聚甲醛固定液固定, 然后参照Eumkeb G等<sup>[6]</sup>的方法处理样品, 在扫描电子显微镜下观察并记录、拍照。

### 1.3.3.2 透射电镜观察

菌液处理同上, 加4%戊二醛4 °C固定过夜; 离心收集菌体, 用1.5%琼脂糖包埋, 凝固后, 切片, 4%戊二醛再固定, PBS冲洗; 梯度浓度乙醇脱水; 再用环氧丙烷、(环氧丙烷+硫酸铜)各处理10 min; 再用3:1、1:1、1:3比例的环氧丙烷:环氧树脂处理30 min, 保存过夜; 最后用Epon818树脂包埋、超薄切片、染色。在透射电镜下观察并记录、拍照<sup>[6]</sup>。

## 1.3.4 合成抗菌肽对细菌细胞膜通透性试验

### 1.3.4.1 K<sup>+</sup>离子泄漏试验

参照Gang Hao等<sup>[6]</sup>, Ubels JL等<sup>[7]</sup>的方法进行。将对数生长期的大肠杆菌F41菌液离心收集菌体, 用pH 7.4的PBS重悬菌体, 加入Tac、TacW、TacK、TacE、TacV、TacS, 分别形成不同浓度梯度的抗菌肽溶液, 菌液浓度为 $2.0 \times 10^7$  CFU/mL, 以去离子水作对照, 室温孵育120 min。测定不同浓度抗菌肽对K<sup>+</sup>离子泄露的影响。另外, 分别将菌悬液和抗菌肽混合, 使抗菌肽浓度达到最小抑菌浓度, 37 °C共同培养60 min, 每隔10 min取样, 测量不同时间抗菌肽对K<sup>+</sup>离子泄露的影响。

### 1.3.4.2 细菌胞内紫外吸收物质的泄漏实验

参照Al-Adham IS等<sup>[8]</sup>的方法进行。取对数生长期大肠杆菌F41, 依次将菌液和抗菌肽混合, 使菌液最终浓度为 $2.0 \times 10^7$  CFU/mL, 抗菌肽浓度达到最小抑菌浓度, 37 °C恒温孵育60 min, 每隔10 min取样, 离心, 取上清液于260 nm测定其吸光值。以TritonX-100处理为阳性对照, 测量胞内紫外吸收物质的泄漏量。另外, 分别将菌悬液和抗菌肽混合, 形成不同浓度梯度的抗菌肽溶液, 菌液浓度为 $2.0 \times 10^7$  CFU/mL, 室温孵育60 min, 测量不同浓度抗菌肽对胞内紫外吸收物质泄漏的影响。

## 1.3.5 合成抗菌肽和细菌基因组DNA相互作用

取对数生长期的大肠杆菌F41菌液离心收集菌体, 采用TIANGEN细菌基因组DNA提取试剂盒(DP302)提取大肠杆菌F41基因组DNA, 加入Tac、

TacW、TacK、TacE、TacV、TacS混合使其终浓度分别为2.5、5、10、20、40、80、160 mg/L, 以灭菌去离子水作对照。室温孵育60 min, 参照Bandyopadhyay S等<sup>[9]</sup>的方法进行0.8%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统拍照观察。

### 1.3.6 数据处理

实验均做3次重复, 数据用SPSS17.0统计软件处理, 数据以均数±标准差( $\bar{X} \pm s$ )表示, 用Origin8.5作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 圆二色谱

圆二色谱结果显示: 在磷酸盐缓冲液(PBS)和模拟细胞膜的三氟乙醇(TFE)中, 抗菌肽Tac、TacW在198 nm附近呈现正的特征峰, 在206~211 nm出现一个宽的负的特征峰, 在230 nm附近出现一个正的特征峰, 表明Tac、TacW在PBS和TFE中均为 $\beta$ -折叠结构, 230 nm附近的正峰为 $\beta$ -转角(图1-a,b); 抗菌肽TacK、TacE在PBS和TFE中的色谱相似, 在198 nm附近有一负峰, 在220 nm附近有一小而宽的正峰, 表明TacK、TacE在PBS和TFE中均为无规则卷曲(图1-c,d); 抗菌肽TacV、TacS在PBS中192 nm附近有一正的特征峰, 在222 nm和208 nm附近呈现两个负的特征峰, 表明TacV、TacS在PBS中呈现 $\alpha$ -螺旋结构, 在TFE中198 nm附近有一负峰, 在220 nm附近有一小而宽的正峰, 表明抗菌肽TacV、TacS在TFE中呈现无规则卷曲(图1-d)。圆二色谱对结构改变很敏感, 广泛用于分析多肽的二级结构。从抗菌肽在模拟疏水细胞膜环境(三氟乙醇溶液)中色谱图<sup>[10]</sup>来分析, 含二硫键Tac和去二硫键的TacW在PBS和TFE中均呈 $\beta$ -折叠结构; 去二硫键的TacE和TacK在PBS和TFE中均呈无规则卷曲, 去二硫键的TacV和TacS在PBS中呈 $\alpha$ -螺旋构象, 在TFE中呈无规则卷曲; 表明二硫键对 $\beta$ -折叠结构并不起作用, 而肽链中不同性质氨基酸组成决定抗菌肽的二级结构, 但二硫键对维持分子结构的稳定性起作用, 这与Gururaj Rao等<sup>[2]</sup>实验观点一致。

### 2.2 合成抗菌肽最小抑菌浓度

由表1可知合成抗菌肽对6种试验菌的抑菌作用存在明显差异, Tac、TacW、TacK、TacV的抑菌较强, TacE、TacS抑制作用相对弱些。本实验是通过合成萤素进行最小抑菌浓度测定, 实验测得MIC和以往结论相比都偏高<sup>[11]</sup>, 这可能由于合成抗菌肽和天然萤素在

一、二级结构差异所致。

### 2.3 合成抗菌肽对大肠杆菌 F41 抑菌动力学

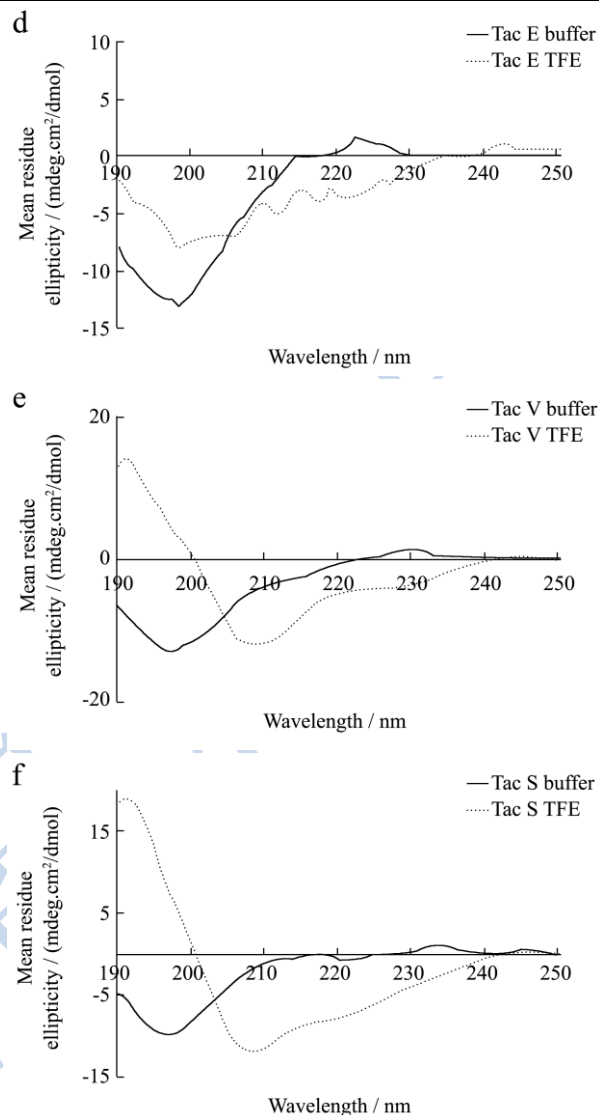
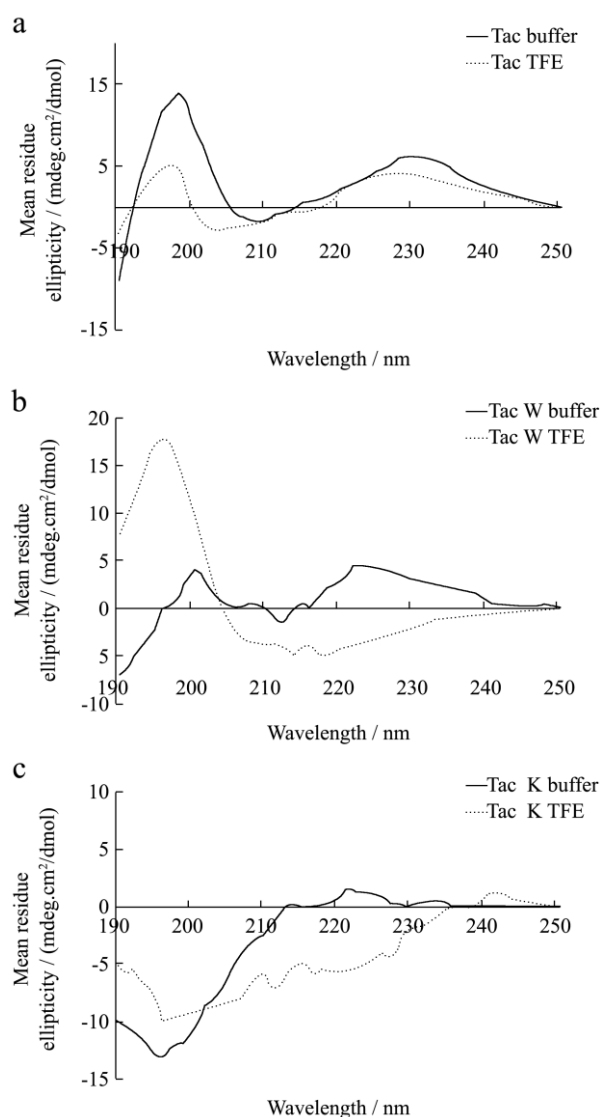


图 1 合成抗菌肽在两种溶液中的圆二色谱

Fig.1 CD spectra of peptides in PBS and 50% TFE

注：(a) Tac, (b) TacW, (c) TacK, (d) TacE, (e) TacV, (f) TacS.

表 1 合成抗菌肽的体外抗菌活性 (MIC) mg/L

Table 1 Antimicrobial activity of synthetic tachyplepsins (MIC) mg/L

peptide strains	MIC	Tac	TacW	TacK	TacE	TacV	TacS
<i>E. Coli</i> F41		5±1	4±1	8±1	80±2	6±1	20±2
<i>E. Coli</i> K88		5±1	4±1	8±1	80±2	6±1	20±2
<i>S.typhimurium</i>		5±1	4±1	8±2	> 80	6±2	20±2
<i>S.aureus</i>		10±1	8±2	16±2	160±2	12±2	40±2
<i>B.subtilis</i>		10±2	8±1	16±2	160±2	12±1	40±2
<i>Pichia.pastoris</i>		20±2	16±2	32±2	> 160	24±1	80±2

抗菌肽和大肠杆菌 F41 孵育不同时间, 细菌存活数随时间变化关系如 (图 2)。6 种合成抗菌肽均具有抑杀作用, Tac、TacW、TacV 在 10 min 内, TacK 在 20 min 内, 明显抑制细菌生长, 随后变化趋缓, 100 min

几乎所有细菌被抑杀。TacW 抑菌效果最强。TacE 作用 20 min 后, 菌落数有少量降低, 随后一直维持稳定的细胞数量, 说明 TacE 仅能抑制细菌繁殖, 并不能够抑杀细菌。TacS 作用 60 min 后, 菌落数达到最低,



随后维持稳定数量, TacS 具有低的抑菌作用。通过抑菌动力学研究, 表明抗菌肽 Tac 和 TacW ( $\beta$ -折叠)、TacV ( $\alpha$ -螺旋)、TacK (无规则) 的抑菌动力学基本一致, 抗菌活力相近, 这表明二硫键结构甚至二级结构对抗菌活力并不是必需的。

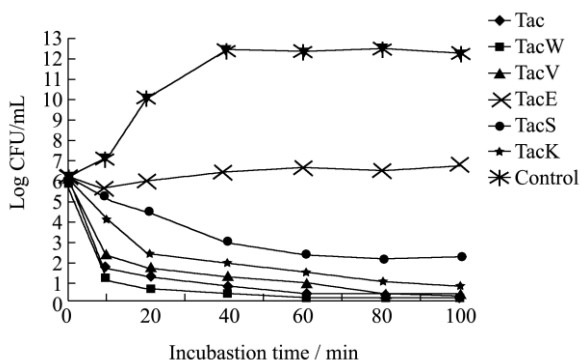


图2 合成抗菌肽作用 *E. coli* F41 的抑菌动力学

Fig.2 Antibacterial kinetics of tachyplepsins for *E. coli* F41

### 2.4 合成抗菌肽对大肠杆菌 F41 超微结构的影响

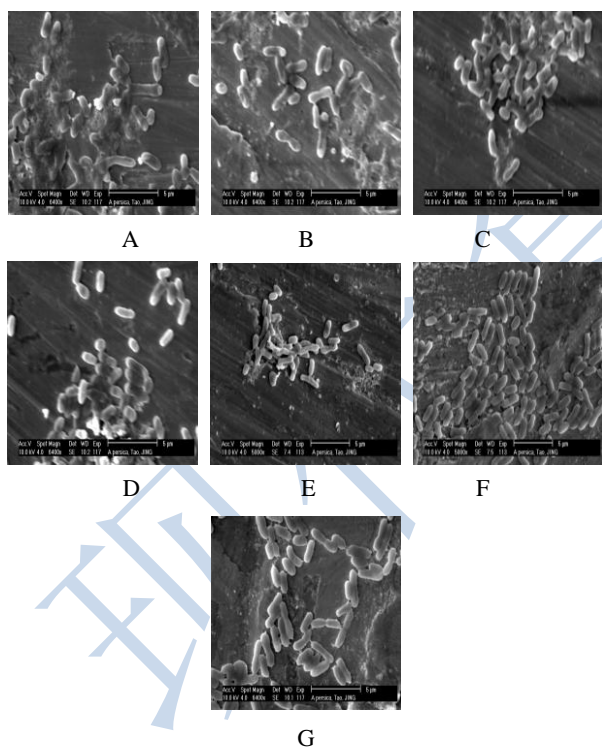


图3 合成抗菌肽作用 *E. coli* F41 的扫描电镜图

Fig.3 SEM images of *E. coli* F41 treated with tachyplepsins

注: (A) TacW; (B) Tac; (C) TacV; (D) TacK; (E) TacS; (F) TacE; (G) Untreated.

从扫描电镜可以看出, TacW和Tac (图3-A,B) 细胞几乎完全裂解, 没有完整的细胞, 只有细胞碎片; TacV和TacK (图3-C,D) 细胞形态发生明显变化, 大

部分细胞破碎, 少数细胞具有完整性, 杆状细胞中部细胞壁膜破坏, 细胞内陷, 导致细胞质大量外泄, 菌群发生粘连, 使破碎和坍塌的细胞膜聚集在一起; TacS (图3-E) 细胞形态发生稍微变化, 大部分细胞具有较完整的杆状结构, 部分细胞壁膜破坏, 细胞内陷, 细胞质浆外泄。TacE与对照组 (图3-F, G) 正常细胞形态规整, 细胞壁膜完整, 菌群未发生粘连成堆, 未发现细胞质外泄现象。

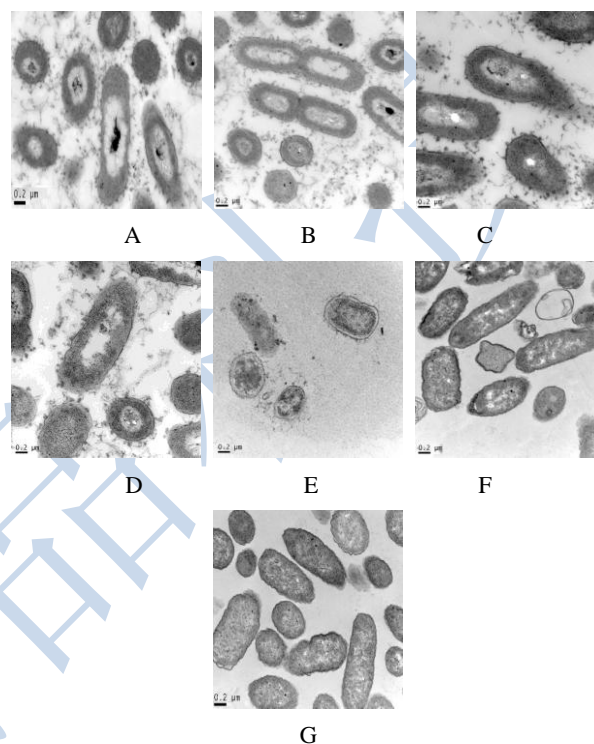


图4 合成抗菌肽作用 *E. coli* F41 的透射电镜图

Fig.4 TEM images of *E. coli* F41 treated with tachyplepsins

注: (A) TacW; (B) Tac; (C) TacV; (D) TacK; (E) TacS; (F) TacE; (G) Untreated.

从透射电镜观察可以看出, TacW和Tac (图4-A, B) 细胞大部分壁膜裂解, 细胞壁膜消失, 表面粗糙, 细胞质内空, 细胞核区凝聚; TacV和TacK (图4-C, D) 多数细胞壁膜消失, 表面粗糙, 细胞质内空, 部分细胞器和细胞核区消失; TacS (图4-E) 细胞形态发生变化, 细胞表面有突起皱褶, 细胞的内容物脱水浓缩, 细胞发生质壁分离, 部分细菌细胞壁完全破裂。TacE和对照组 (图4-F, G) F41细胞结构完整, 细胞外观平滑, 细胞壁膜完整, 细胞饱满, 细胞内容物充实、致密。经扫描和透射电镜 (图3, 4) 显示, 合成螯素肽不仅作用于细胞壁膜, 还能破坏细胞膜结构, 并能通过细胞膜作用于胞内物质, 但不同抗菌肽对大肠杆菌细胞膜结构破坏程度不同, 推测对细胞膜作用异同的原因可能与抗菌肽结构类型, 浓度、作用时间长短等有关。

### 2.5 合成抗菌肽对细胞膜通透性的影响

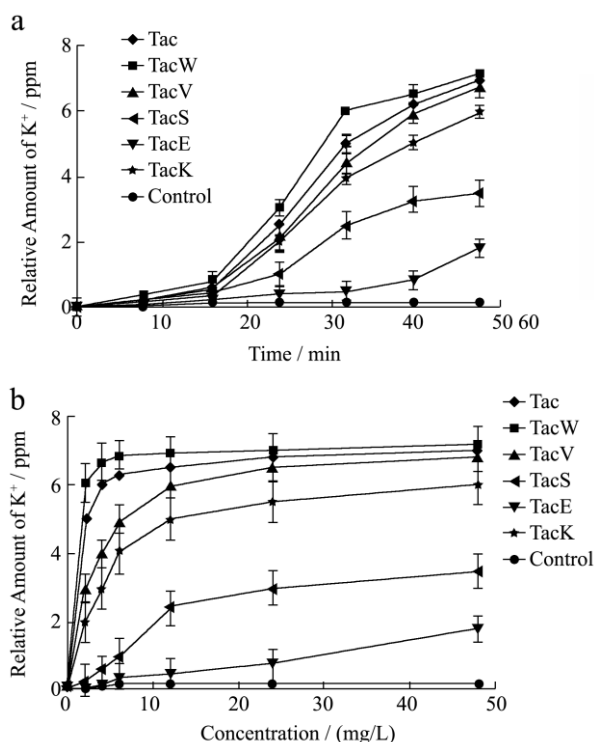


图5 合成抗菌肽作用 *E. coli* F41 的  $K^+$  离子泄露实验

Fig.5  $K^+$  ion leakage in *E. coli* F41 with tachyplepsins

注: a.不同时间对  $K^+$  离子泄露影响; b.不同浓度对  $K^+$  离子泄露影响。

抗菌肽浓度对大肠杆菌F41的 $K^+$ 离子泄露的影响如(如图5b), Tac、TacW、TacV和TacS处理组的 $K^+$ 泄露水平明显高于TacE处理组和对照组,随着各抗菌肽浓度增加, $K^+$ 泄露逐步上升,达到各自最小抑菌浓度时,泄露量趋向达到最大; Tac、TacW、TacV处理组的 $K^+$ 泄露量大致是TacS的2倍, TacE的4倍, TacK的1.2倍。抗菌肽作用时间对 $K^+$ 离子泄露的影响如(如图5a),随着时间的延长,各抗菌肽对 $K^+$ 泄露逐渐升高, Tac、TacW、TacV作用20 min后 $K^+$ 离子泄露急剧上升,40 min后趋向最大泄露量; TacS作用30 min后 $K^+$ 泄露逐渐上升,50 min后趋于平缓达到最大; TacE作用50 min后 $K^+$ 离子泄露才开始缓慢上升。

抗菌肽浓度对大肠杆菌F41胞内紫外吸收物质泄露影响如(图6b)所示。当作用浓度在达到各自抗菌肽的MIC前,紫外物质泄露很少,变化缓慢;当浓度处于1-4倍MIC之间时,泄露量急剧上升;而当浓度达到4倍MIC时,泄露量趋向达到最高值。抗菌肽作用时间对胞内紫外吸收物质泄露影响(如图6a),紫外吸收物质泄露随着时间的延长逐渐升高, Tac、TacW、TacV作用30 min以内,紫外吸收物质泄露缓慢,当作用30 min后,紫外吸收物质开始大量泄露; TacK作用

40 min后才开始大量泄露;而TacS作用50 min后开始大量泄露; TacE对紫外吸收物质泄露,基本不发生变化。

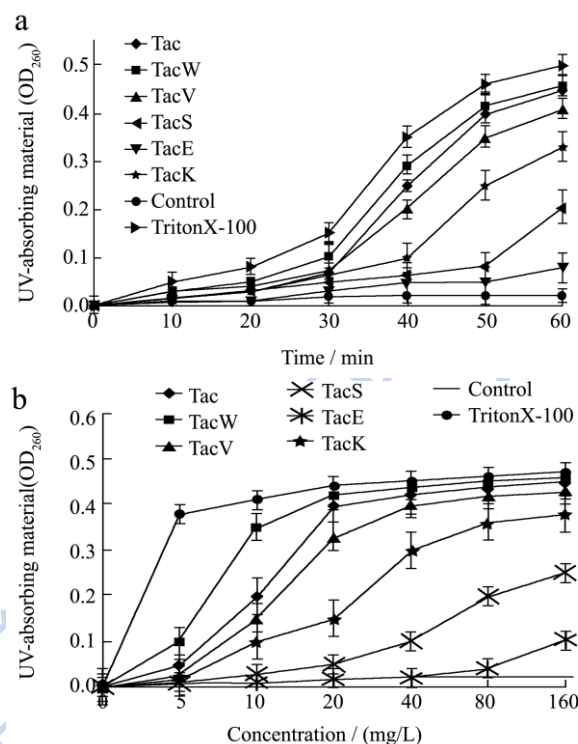


图6 合成抗菌肽作用 *E. coli* F41 的紫外吸收物质渗透实验

Fig.6 Permeability test for UV-absorbing substances in *E. coli* F41 with tachyplepsins

注: a.不同时间对紫外吸收物质泄露影响; b.不同浓度对紫外吸收物质影响。

大肠杆菌F41胞内 $K^+$ 离子和紫外吸收物质的泄露与细胞膜通透性有关,与抗菌肽的作用浓度和作用时间有关(图5,6),同时与抗菌肽的结构有关。低浓度抗菌肽在胞膜表面积聚,形成孔道,少量胞内物质泄露;而浓度增大后,除了积聚在细胞膜形成孔道,多余的抗菌肽进入细胞内,和胞内的蛋白质、DNA等物质发生结合、裂解作用,致使胞内物质大量泄露<sup>[12]</sup>。另外抗菌肽作用时间对胞内物质泄露影响的实验表明,抗菌肽作用细胞膜是逐渐积累的过程,0~30 min内是抗菌肽和细胞膜吸附结合阶段,胞内物质外泄不明显;随着抗菌肽不断积累,抗菌肽插入细胞膜,形成孔道,甚至裂解细胞膜,导致胞内物质大量泄露。

### 2.6 合成抗菌肽对细菌基因组 DNA 作用结果

通过凝胶电泳图可以看到,如(图7-A) Tac处理组,1~6电泳条带逐渐模糊,有明显的阻滞作用,7~10孔道,即Tac浓度大于60 mg/L后未发现DNA条带;(图7-B) TacW处理组,1~5电泳条带逐渐模糊,有明显的阻滞作用,6~10孔道,即Tac浓度大于40 mg/L后未发

现DNA条带；(图7-C) TacV处理组, 8~10孔道, 即Tac浓度大于80 mg/L后未发现DNA条带；(图7-D) TacK处理组, 1~10孔道均出现DNA条带；(图7-E) TacS处理组, 9~10孔道, 即Tac浓度大于120 mg/L后未发现DNA条带；(图7-F) TacE处理组, 1~10电泳孔道均出现DNA条带。抗菌肽Tac、TacW、TacE、TacV、TacK、TacS对基因组DNA的凝胶电泳图有明显区别。可能原因: TacW的疏水性比Tac增强, 更容易结合到DNA双螺旋疏水内部, TacS极性增加, 降低其和DNA结合的强度; TacK过量的正电荷降低其穿膜效率, 未能与DNA结合; 抗菌肽和溴化乙锭(EB)竞争结合基因组DNA, 依靠范德华力和静电力结合到DNA双螺旋表面<sup>[13]</sup>。抗菌肽在较低浓度时结合到DNA表面, 起到阻滞DNA迁移率的作用; 高浓度的抗菌肽通过静电作用力结合到DNA双螺旋表面, 竞争并阻碍EB和DNA的结合, 从而在凝胶电泳中未发现电泳条带。

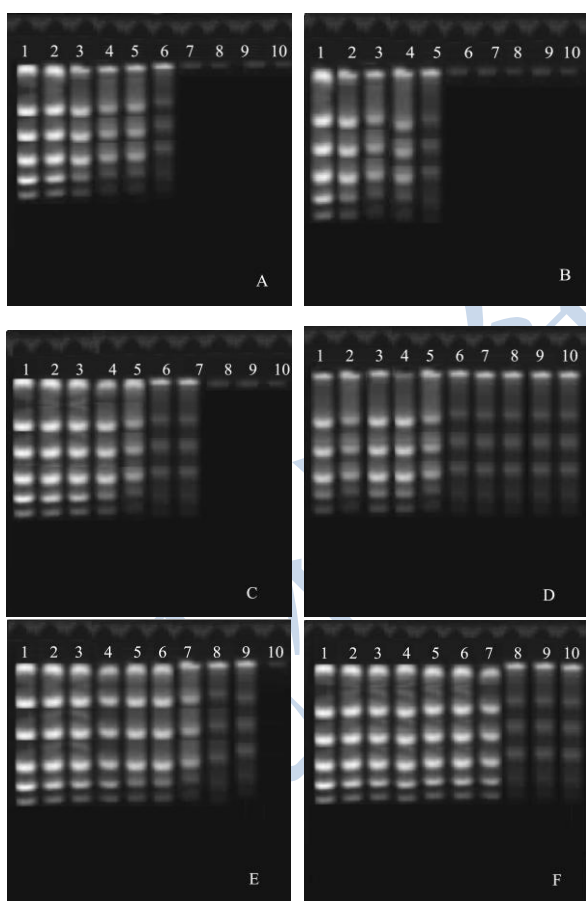


图7 不同合成抗菌肽和大肠杆菌基因组的凝胶阻滞实验

Fig.7 Gel retardation assays for various synthetic tachyplepsins in the *E. coli* genome

注: (A) Tac, (B) TacW, (C) TacV, (D) TacK, (E) TacS, (F) TacE; Lane1: H<sub>2</sub>O, Lane2-10:5, 10, 20, 40,60,80,100,120,160 mg/L。

### 3 结论

3.1 通过设计合成鲨素的衍生肽, 分别用负电性的谷氨酸(E), 正电性的赖氨酸(K), 疏水性芳香族氨基酸(W), 亲水性丝氨酸(S), 疏水性脂肪族缬氨酸(V)替换天然鲨素中半胱氨酸(C), 研究天然抗菌肽中二硫键、带电性、水脂两亲性及二级结构对抗菌机理的影响。从抗菌活力来看, TacW>Tac>TacV>TacK>TacS>TacE, 同为 $\beta$ -折叠 TacW>Tac; 同为 $\alpha$ -螺旋 TacV>TacS; 同为无规则 TacK>TacE; 这表明抗菌活力和结构中的阳离子型的氨基酸残基和疏水性氨基酸的比例有关, 这与 Imura Y 等<sup>[14]</sup>实验观点一致。原因可能, 正电荷量多少影响抗菌活性的强弱, 正电荷有助于低浓度抗菌肽在膜表面富集达到有效杀菌浓度; 当正电荷达到一定数目后, 再增加正电荷, 抗菌活性反而降低。抗菌活力 TacK>TacE, 但电泳图(图7-D, F)显示实验结果却是相似的, 表明 TacK仅结合细胞膜上形成孔道, 并没有进入细胞和DNA作用。这是由于过多电荷的 TacK能牢固结合在磷脂头部, 大大降低其穿膜效率; 同时正电荷数过高会导致抗菌肽分子间静电斥力强于其与膜的静电引力, 阻碍膜上抗菌肽的聚集和穿膜孔道的形成, 最终表现为膜裂解能力下降。抗菌肽的抗菌活性随水脂两亲性降低而减弱, 适当对两亲结构进行改造, 如 TacV通过改变肽链中 Val 数量来改变其疏水性, 从而影响其活性。疏水基团可以使肽链在溶液中通过疏水作用形成多聚体, 增加对细胞膜的亲和力, 增强裂解细胞膜的能力<sup>[15]</sup>。从电镜实验结果(图3, 4)来看, 抗菌肽 Tac、TacW、TacV可以裂解细胞膜, 也通过孔道穿膜进入细胞内, 作用核区基因组DNA发生凝聚(如图4-A, B)。另外抗菌肽进一步渗透到细菌核区, 与DNA结合, 抑制了DNA的复制和转录过程<sup>[16]</sup>。关于抗菌肽和基因组DNA的结合方式, 以及如何影响DNA表达、蛋白质合成的有待进一步研究。

3.2 本文探索了合成抗菌肽结构和功能的关系, 为研究抗菌肽的分子作用机制提供依据, 抗菌肽首先作用细胞膜, 随着作用时间和浓度效应变化, 细胞膜通透性增加, 胞膜裂解, 这表明细胞膜是其首要和重要作用靶点; 抗菌肽进入细胞内, 结合胞内蛋白质、DNA等物质, 形成次级作用靶点, 并抑制复制、转录等多种作用机制, 形成多个作用靶点, 是一种多效的协同的作用机制。

### 参考文献



- [1] Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II. Chemical structures and biological activity [J]. *J. Biochem.*, 1989, 106(4): 663-668
- [2] Gururaj Rao. Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 361(1): 127-134
- [3] Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, et al. *In vitro* susceptibility tests for cationic peptides: comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(6): 1694-1696
- [4] Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C, et al. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(6): 2005-2010
- [5] Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* [J]. *Phytomedicine*. 2013, 20(3-4): 262-269
- [6] Gang Hao, Yong-Hui Shi, Ya-Li Tang, et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin2 [J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1421-1427
- [7] Ubels J L, Van Dyken R E, Louters J R, et al. Potassium ion fluxes in corneal epithelial cells exposed to UVB [J]. *Exp. Eye Res.*, 2011, 92(5): 425-431
- [8] Al-Adham I S, Ashour H, Al-Kaissi E, et al. Studies on the kinetics of killing and the proposed mechanism of action of microemulsions against fungi [J]. *Int. J. Pharm.*, 2013, 454(1): 226-232
- [9] Bandyopadhyay S, Lee M, Sivaraman J, et al. Model membrane interaction and DNA-binding of antimicrobial peptide Lasioglossin II derived from bee venom *Biochem Biophys Res Commun*. 2013, 430(1): 1-6
- [10] Chen Y, Mant C T, Farmer S W, et al. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index [J]. *J. Biological. Chem.*, 2005, 280: 12316-12329
- [11] 谢海伟,代建国,郭勇,等. 萤素抗菌肽的分子结构稳定性及生物活性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, 36(4): 144-150
- XIE Hai-wei, DAI Jian-guo, GUO Yong, et al. Molecular structure stability and biological activity of antibacterial peptide tachyplesin [J]. *Journal of South China University of Technology Natural science Edition*, 2008, 36(4): 144-150
- [12] Joshi S, Bisht GS, Rawat DS, et al. Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and *E. coli* ATCC 11775 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(10): 1864-1875
- [13] Haney EF, Petersen AP, Lau CK, et al. Mechanism of action of puromidine derived tryptophan-rich antimicrobial peptides [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2013, 1828(8): 1802-1813
- [14] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, 68(5): 1160-1169
- [15] Timothy Doherty, Alan J Waring, et al. Peptide-lipid interactions of the  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptide tachyplesin and its linear derivatives from solid-state NMR [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, 1758(9): 1285-1291
- [16] 苗建银,柯畅,郭浩贤,等. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 233-240
- MIAO Jian-yin, KE Chang, GUO Hao-xian, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(1): 233-240