

抗菌肽 Bufenin II 衍生物特异性结合金黄色葡萄球菌 DNA 抑菌机理的研究

郝刚^{1*}, 乐国伟², 施用晖²

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 江南大学 食品学院, 无锡 214122)

摘要: 旨在研究抗菌肽 Bufenin II 的衍生物 BF2-A/B 作用于金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的抑菌机制。原子力显微镜观察了 BF2-A/B 对金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的结合作用, 用凝胶阻滞试验分析了 BF2-A/B 结合 DNA 的能力, DNase I 足迹试验研究衍生物与基因组 DNA 结合的特异性, 并考察了对细胞呼吸作用和 ATP 合成的影响。结果显示, BF2-A/B 都能结合基因组 DNA, BF2-B 的结合能力比 BF2-A 强, 并且都趋向特异性结合基因组 DNA 上的 2 个区段, 其中 1 个是 23S rRNA 基因上的 1 段保守序列, 衍生物还影响细胞的氧化磷酸化过程, 显著抑制细胞呼吸作用和 ATP 合成, BF2-B 的抑制比 BF2-A 更强烈。研究结果说明 BF2-A/B 是通过渗透细胞膜进入细胞质, 特异性结合基因组 DNA 上的 2 个区段, 并抑制细胞呼吸作用和 ATP 合成而杀菌。BF2-B 结合 DNA 的能力更强, 抑制细胞呼吸作用和 ATP 合成的能力更强, 因此具有更强的抑菌活性。

关键词: 抗菌肽; Bufenin II; 金黄色葡萄球菌; DNA 作用; 抑菌机理

中图分类号: S852.42

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)07-1154-08

The Bactericidal Mechanism of Two Analogues of the Antimicrobial Peptide Bufenin II Specific Binding to *Staphylococcus aureus* Genomic DNA

HAO Gang^{1*}, LE Guo-wei², SHI Yong-hui²

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the bactericidal mechanism of BF2-A/B, two analogues of antimicrobial peptide Bufenin II, specific binding to *Staphylococcus aureus* genomic DNA had been researched. The results of atomic Force Microscope scan and gel retardation assay showed that both peptides could strongly bind to DNA, and the ability of BF2-B binding to DNA was stronger than that of BF2-A. The results of DNase I footprinting assay showed that both peptides tended to specifically bind to two domains of *S. aureus* genomic DNA, and one of them probably was a fragment of consensus sequence located on the 23S rRNA gene. Furthermore, the results of interference assay to the oxidation phosphorylation of cells suggested that both peptides could obviously inhibit the respiration of *S. aureus*, inducing a drop in ATP content. Interestingly, BF2-B induced a more remarkable inhibition than BF2-A. The results of researches demonstrated that the powerful antimicrobial activities of both peptides were closely related to penetrate the cytoplasmic membrane then specifically bind to two domains of genomic DNA, and inhibit the cell respiration and ATP synthesis. The increase of ability of binding to DNA and inhibiting cell respiration and ATP synthesis explained why BF2-B displayed more excellent antimicrobial activity for *S. aureus*.

收稿日期: 2014-01-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费(2014NZYQN46); 国家自然科学基金(31172214); 十二五支撑计划(2012BAD33B05)

作者简介: 郝刚(1978-), 男, 重庆人, 博士, 主要从事抗菌肽的研究, Tel: 86-28-88434002; E-mail: indianahg@hotmail.com

* 通信作者: 郝刚

Key words: antimicrobial peptides; buforin II; *Staphylococcus aureus*; DNA action; bactericidal mechanism

自 20 世纪 70 年代瑞典科学家 H. G. Boman 等^[1]在天蚕血淋巴中首次发现抗菌肽后,人们相继在两栖动物、昆虫、鱼类、哺乳动物等^[2-3]多种生物中发现了大量的抗菌肽。抗菌肽一直是生命科学研究的热点之一,特别是在目前抗生素耐药性日益严峻的情况下,抗菌肽的应用价值倍受重视。抗菌肽种类繁多,不同抗菌肽抑菌的作用机制不同,尚没有一个涵盖所有抗菌肽作用机理的理论。由于天然抗菌肽大多以细胞膜为主要作用靶点,因此各国学者研究抑菌机理主要集中在膜作用机制上^[4-5]。近年来,随着对抗菌肽作用机理的深入研究,人们发现有些抗菌肽并不破坏膜结构,而是直接穿过胞膜,作用于胞内靶点达到抑菌目的。这种独特的抑菌机制使得它的抗菌活性不受细胞膜成分的影响,无论对 G⁺、G⁻ 菌还是真菌都有较强的抑菌活性,抗菌谱较广,不易产生耐药性。目前研究者已经找到了多种胞内作用的靶分子,如核酸、蛋白和信号转导通路等^[6],这些肽通过影响基因的复制、表达或调控,抑制呼吸作用,摧毁细胞骨架,抑制和影响胞内的信号传导及其网络调控,改变细胞的生化代谢来杀伤微生物。

抗菌肽 Buforin II 是韩国学者 C. B. Park 等^[7]从亚洲蟾蜍的胃组织中分离纯化的有 21 个残基的抗菌肽。Buforin II 抗菌活性很强,它不溶解细胞,杀菌迅速,没有滞后期^[8],具有高效的穿膜效率,在低于最小抑菌浓度下,也能穿透细胞膜并在细胞内积累^[9-10]。Buforin II 进入细胞后,通过与胞内 DNA/RNA 紧密结合,抑制基因的复制和表达,最终起到杀菌作用^[11]。C. B. Park 等在研究它的构效关系时,在其 N-端截去了 4 个冗余残基后产生了 1 个衍生肽,它的抑菌活性比 Buforin II 还要强^[12]。在前期研究中,笔者将此衍生肽命名为 BF2-A (RAGLQFPVGRVHRLLRK),并在其结构特征基础上设计并化学合成了 1 个新的衍生肽,命名为 BF2-B (RAGLQFPLGRLLRLLRRL LR)^[13],研究发现 BF2-B 的抗菌活性比 BF2-A 强,杀菌也比 BF2-A 迅速。笔者前期研究了这 2 个衍生肽对金黄色葡萄球菌细胞膜的作用机制^[14],现拟通过原子力显微镜和凝胶阻滞试验考察 BF2-A/B 对金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的结合作用,并研究分析了肽与 DNA 结合的特异性,以及抗菌肽作用基因组

DNA 后对金黄色葡萄球菌的呼吸作用和 ATP 合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 衍生肽 BF2-A/B 目的肽由上海波泰生物科技有限公司采用 Fmoc 固相化学合成法合成,RP-HPLC 分离纯化,纯度 $\geq 95\%$ 。

1.1.2 菌种 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538),由笔者实验室提供。

1.1.3 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 将培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌收集,柱式抽提试剂盒提取基因组 DNA,紫外分光光度计检测 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}=1.96 > 1.80$,符合实验要求。

1.1.4 主要试剂和仪器 虫荧光素酶,虫荧光素, Promega 公司; DNase I, 华美生物工程有限公司;柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,生工生物工程(上海)有限公司;DY-A 电泳仪,上海生化所西巴斯生物技术有限公司;凝胶成像分析仪,美国 UVP 有限公司;原子力显微镜;本原纳米仪器有限公司;C10-3 型溶氧电极,美国 NBS 公司;MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统,西安瑞迈分析仪器有限公司。

1.2 抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抗菌活性检测

按最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定法检测 BF2-A/B 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。将培养至对数生长期的待测菌液加入 96 孔细胞培养板,每孔 50 μL ,再向各孔中加入 50 μL 经倍比稀释的抗菌肽 BF2-A/B,使各孔中抗菌肽浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。阴性对照为加入无菌水,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h,酶标仪在 $\lambda=630\text{ nm}$ 检测 OD 值。与初始值相比,OD 值未有显著变化的最小浓度定义为抗菌肽对该菌的最低抑菌浓度。

1.3 原子力显微镜扫描抗菌肽与 DNA 的结合

配制 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金黄色葡萄球菌基因组 DNA,加入不同浓度的抗菌肽。室温放置 10 min,将抗菌肽-DNA 复合物 10 μL 滴加到裸云母表面,倾斜 45 $^{\circ}$ 让液滴在云母片上流动,滤纸条沿液滴边缘将残液吸去。氮气吹干 3 min,将制备的样品

置于原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)扫描台上。在空气中室温下利用接触模式成像。试验采用 100 μm 扫描器,氮化硅探针,针尖曲率半径约 10 nm,力常数约 158 $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ 或 218 $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$,扫描速率 12~115 Hz。AFM 图像经过自带软件(IP 211 版)的平滑处理,以消除低频背景噪声^[15]。

1.4 DNA-肽结合凝胶阻滞试验

用 DNA 结合缓冲液^[16] (5% 甘油, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH8.0, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA) 溶解抗菌肽 BF2-A/B, 作梯度稀释。在离心管中加入 5 μL 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 溶液,再分别加入 5 μL 经梯度稀释的抗菌肽溶液,阴性对照为 PBS 缓冲液。室温下孵育 10 min 后,加入上样缓冲液,0.7% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶成像分析仪观察记录结果。

1.5 DNA 与抗菌肽的特异性结合研究

1.5.1 DNase I 足迹试验法(footprinting assay)

在 PCR 管中加入 1 μL 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金黄色葡萄球菌基因组 DNA,加入 1 μL 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌肽,阴性对照为超纯水,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 min。分别加入冰浴的 5 μL $\text{MgCl}_2/\text{CaCl}_2$ 溶液 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 过滤除菌) 和 2 μL 反应缓冲液 (200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES-KOH (pH7.9), 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺, 0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸锌, 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白, 10% (V/V) 甘油, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 后,每管加入 1 μL 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DNase I (DNase I 溶于 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl (pH8.0), -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存,使用前稀释于冰浴的 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl), 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 min 后立即加入 5 μL 反应终止液 (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0), 1% (m/V) SDS, 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ L 酵母 tRNA) 终止反应。加入 3 μL 上样缓冲液,2% 的琼脂糖凝胶电泳,电泳 30 min 后用凝胶成像分析仪观察记录结果。

1.5.2 DNA 切割条带凝胶回收 选取基因组 DNA 经肽保护后,免受 DNase I 酶切的条带切胶回收,称重后切碎。加入等体积的融胶液,混匀,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min 至胶全融。加入到 DNA 纯化柱内,室温放置 1 min 后,14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,倒弃收集管内的液体。在 DNA 纯化柱内加入 700 μL 洗涤液,室温放置 1 min,14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1

min,洗去杂质,并重复 1 次。将 DNA 纯化柱置于 1.5 mL 离心管上,加入 30 μL 洗脱液至管内柱面上,放置 1 min 后 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,收集滤液,即为切割条带的 DNA 溶液。

1.5.3 DNA 特异性结合序列的测序 与抗菌肽特异性结合的 DNA 区段的序列测定由上海杰李生物技术有限公司完成。

1.5.4 DNA 序列相似性搜索 BLAST 程序组:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>。

1.6 抗菌肽作用细菌后对细胞呼吸作用的影响

将培养至对数生长期后期的金黄色葡萄球菌离心,生理盐水洗涤,用细菌基本培养基(葡萄糖 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15 g, KH_2PO_4 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, 柠檬酸钠 0.05 g, L-精氨酸 0.01 g, 水 100 mL) 重悬至 1×10^8 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,移取 29 mL 菌悬液至三角锥瓶中,分别加入 1 mL 抗菌肽,使其终浓度为 5 MIC,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡培养,加入纯水作为阴性对照。以初时刻菌悬液的溶氧率为 100%,空气中的溶氧率为 0%,用 C10-3 型溶氧电极(美国 NBS 公司)测不同时刻下菌悬液的溶氧率^[17]。试验重复 3 次,数据取其平均值。

1.7 抗菌肽作用细菌后对细胞 ATP 生产的影响

将培养至对数生长期后期的金黄色葡萄球菌离心,生理盐水洗涤,分别加入 100 μL LB 培养基,800 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖/PBS 溶液,以及 100 μL 抗菌肽,混匀,使其终浓度为 5 MIC,加入纯水作为阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间,离心 3 min,去上清。沉淀物加入 100 μL 生理盐水重悬,混匀,取 90 μL 菌悬液于新离心管中,加入 100 μL 0.05% 的苯扎溴铵和 10 μL 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,混匀,放置 3 min 作为 B 液。在容量瓶中加入 69 μL 虫荧光素酶和 49 μL 虫荧光素,定容至 13 mL,混匀放置 20 min,作为 A 液。在石英管中吸取 100 μL B 液,加入 400 μL A 液,混合 15 s,放入 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统检测溶液的发光强度信号^[18]。

2 结果

2.1 抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抗菌活性

衍生肽对金黄色葡萄球菌的抗菌活性以最低抑菌浓度(MIC)来表示,结果见表 1。经过重新设计的 BF2-B 对金葡萄的抑菌活性要比 BF2-A 强 1 倍。这个结果与前期在大肠杆菌的抗菌活性研究结果一致。

表 1 抗菌肽 BF2-A/B 对金葡萄的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of BF2-A/B for *S. aureus*

Microorganism	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	BF2-A	BF2-B
<i>S. aureus</i>	2	1

2.2 原子力显微镜扫描抗菌肽与 DNA 的结合

采用原子力显微镜技术,观察分析 BF2-A/B 与 DNA 的相互作用(图 1)。图 1a 显示未加抗菌肽的 DNA 分子为松散舒展的长链状,链段较长,且多条 DNA 链相互聚集缠绕,形成大的凝聚团。图 1b 是

加入 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BF2-A 后的 DNA 分子图像,图中明亮白色小点为肽分子,BF2-A 能与 DNA 结合,DNA 链可与肽分子形成串珠状复合物。图 1c,d 是加入不同浓度 BF2-B 后的 DNA 分子图像,在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,能很清楚地看到肽分子吸附在 DNA 链上,但当 BF2-B 浓度高达 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,由于 BF2-B 与 DNA 的强烈结合作用,DNA 链上吸附太多的肽分子,形成一个突起的山脊(白色小亮点),而接触式扫描的纳米探针无法扫描到深谷(DNA 链),因此无法看到 DNA 链,但顺着这些突起的小亮点,就是 1 条 DNA 链。结果显示 BF2-B 与 DNA 的结合能力要强于 BF2-A。

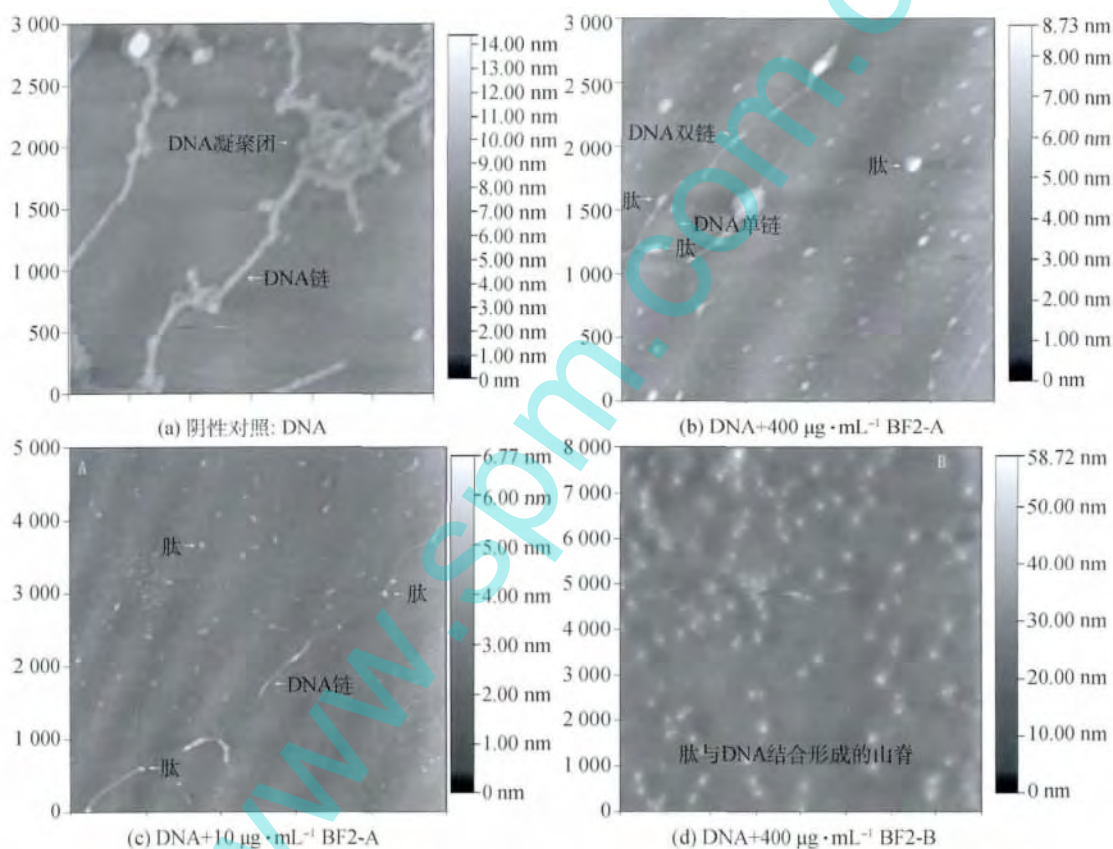


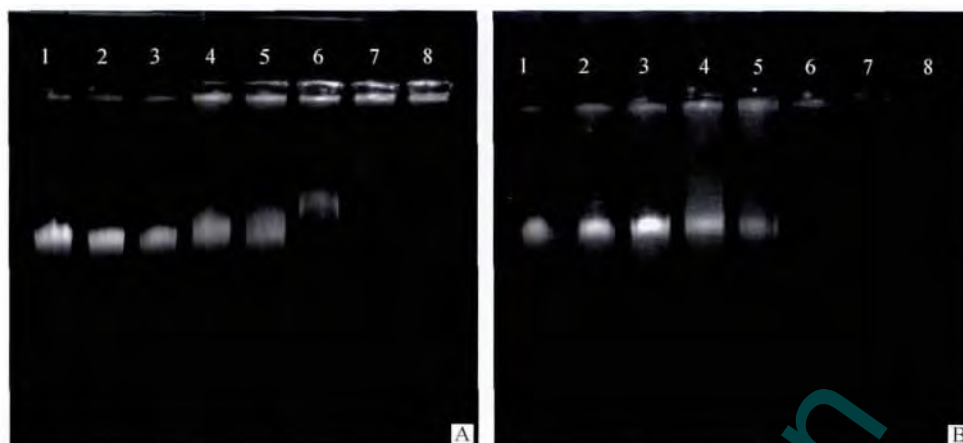
图 1 抗菌肽与细菌 DNA 结合的原子力显微镜观察

Fig. 1 AFM image of *E. coli* genomic DNA with peptides

2.3 DNA-肽结合凝胶阻滞试验

BF2-A/B 与 DNA 结合后可使复合分子增大,导致电泳时 DNA 的运动速度减慢,泳动滞后。进一步采用凝胶阻滞试验验证了抗菌肽 BF2-A/B 与 DNA 的结合能力,结果见图 2。当 BF2-A 为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,即开始有阻滞现象,当达到 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,BF2-A 与 DNA 的强烈结合已经使 DNA 无法跑出点样孔。当 BF2-B 为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

时阻滞已开始,当达到 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与 BF2-B 的结合使得 DNA 一直保留在点样孔里,甚至当大于 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,BF2-B 与 DNA 结合程度使得 EB 无法竞争插入到 DNA 的碱基对中,使点样孔中的 DNA 没有发出荧光。结果不仅说明 BF2-A/B 能与 DNA 强烈结合,而且 BF2-B 结合 DNA 的能力比 BF2-A 强。



A. BF2-A, 1~8. 0、0. 1、0. 2、0. 4、0. 6、1. 1、2. 2、4. 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; B. BF2-B, 1~8. 0、0. 01、0. 05、0. 1、0. 2、0. 4、0. 6、1. 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

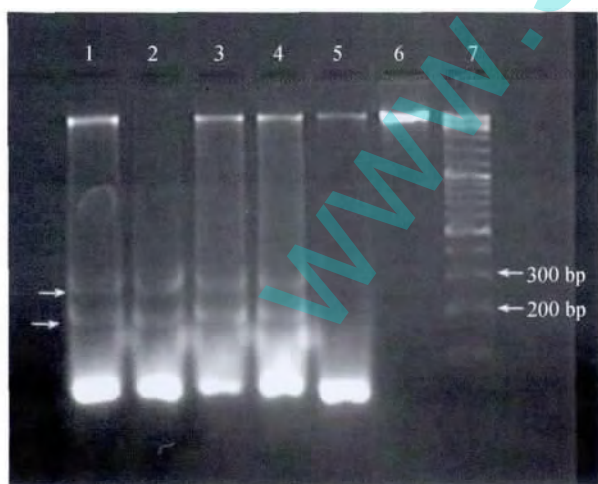
图2 DNA-抗菌肽结合凝胶阻滞电泳图

Fig.2 Gel retardation assay of DNA-peptides binding

2.4 抗菌肽与 DNA 的特异性结合研究

2.4.1 肽与 DNA 特异性结合的 DNase I 足迹试验

用 DNase I 足迹试验来考察抗菌肽与 DNA 的特异性结合,如图 3 所示。DNA 经 DNase I 消化后,产生了连续的 DNA 片段梯度群体,尤以小分子的片段居多,而将 BF2-A/B 与 DNA 孵育后,再经 DNase I 切割,产生了 2 条受保护的条带,相对分子质量分别接近 200 和 300 bp,并且重复切割其条带位置不变。这说明 BF2-A/B 能够特异性的结合金黄色葡萄球菌基因组 DNA。经 BF2-A 保护后的切割条带没有 BF2-B 结合后的明显,这可能是 BF2-B



1,2. BF2-A + DNA + DNase I ; 3,4. BF2-B + DNA + DNase I ; 5. DNA + DNase I ; 6. Genomic DNA ; 7. DNA marker

图3 抗菌肽与 DNA 特异性结合的 DNase I 足迹试验

Fig.3 DNase I footprinting assay of specific binding of peptides to DNA

结合 DNA 能力更强的原因。

2.4.2 DNA 特异性结合区段的序列测定及相似性比对

经杰李生物公司测序,相对分子质量接近 300 bp 的 DNA 片段实际为 254 个碱基对,序列如下:

```

1  CTACTAAGAG, TCGATGATGG, ACG-
   CGAACTA, ACACCGATAT, GCTTCGGGGGA
5  GCGGTGAGTA, CGCTTTGATC, CG-
   GAGATTTTC, CGAATGGGGC, AACCCAATCA
101 GCTTAGTTCGC, TGATTACTTG, AC-
   TAGTGAAT, ACATAGCTAG, CAAGAGGTAG
151 ACGCAGTGAA, CTGAAACATC, TT-
   AGTAGCTG, CAGGAAGAGA, AAGAAACATC
201 GATTCCCTGA, GTAGCGGCGA, GC-
   GAAAAGGG, AAGAGCCCAA, ACCAACAAGC
251 AAAC
  
```

经在 NCBI 网站上用 BLAST 程序组进行序列比对,发现这段 DNA 与肉葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、发酵乳杆菌、粪肠球菌等细菌的 23S rRNA 的基因序列具有相对不同的序列同源性。如图 4 所示,以枯草芽孢杆菌为例, DNA 片段的 3~245 位的碱基与枯草芽孢杆菌 23S rRNA 基因上 2 240~2 480 位上的序列有 79% 的相似性。在这些细菌的 23S rRNA 基因中存在一段很保守的序列区,因此推测这段 DNA 也是金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的 23S rRNA 基因序列中的保守区段。同时也提示 BF2-A/B 也可能与其它细菌 23S rRNA 基因上的这段保守序列特异结合。

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AM295250.1	Staphylococcus carnosus subsp. carnosus TM300 complete genome	202	804	91%	2e-50	83%	
D88802.1	Bacillus subtilis DNA for pheB-rrnE-groESL region, complete cds	176	176	95%	1e-42	80%	
AF008220.1	Bacillus subtilis rrnB-dnaB genomic region	159	159	95%	1e-37	79%	

```
>gb|AF008220.1|AF008220 D Bacillus subtilis rrnB-dnaB genomic region
Length=220060
```

Features in this part of subject sequence:

rRNA-23S ribosomal RNA

```
Score = 159 bits (86), Expect = 1e-37
Identities = 200/252 (79%), Gaps = 20/252 (7%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 3 ACTAAGAGTCGATGATGGACGCGAACTAACACCGATATGCTTCGGGGAGCGGTGAGTACG 62
      ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2 240 ACTAGGAGCCGATGAAGGACG-GGACGAACACCGATATGCTTCGGGGAGCTGTAAGCAAG 2 298

Query 63 CTTTGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGCAACCCAATCAGCT--TAGTCGC-TGAT-TACT 118
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2 299 CTTTGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGAAACCCAC-CA-CTCGTAATGGAGTGGTATCCA 2 356

Query 119 TGACTAGTGAATACATAGC-TA-GCAAGA-GGTAGACGCAGTGAAGTGAACATCTTAGT 175
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2 357 T-A-TC-TGAATTTCATAGGATATG-A-GAAGGCAGACCCGGGGAAGTGAACATCTTAGT 2 411

Query 176 AGCTGCAGGAAGAGAAAGAAACAT-CGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCGAAAA-GGGAAG 233
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2 412 ACCCGGAG-AAGAGAAAGCAA-ATGCGATTCCCTGAGTAGCGGCGA-CGAACACGGGATC 2 468

Query 234 AGCCCAAACCAA 245
      ||||| ||||| |||||
Sbjct 2 469 AGCCCAAACCAA 2 480
```

图 4 DNA 片段序列相似性搜索

Fig. 4 The consequence of sequence homology of DNA fragment

2.5 抗菌肽作用细菌后对细胞呼吸作用的影响

抗菌肽作用金黄色葡萄球菌后对细胞呼吸作用的影响可以间接显示电子传递链的完整性,如图 5 所示。与阴性对照相比,加入了 BF2-A/B 的菌悬液中溶氧率高很多,说明 2 个抗菌肽都显著的抑制了细菌的呼吸作用,使菌悬液中溶解的氧消耗减慢。

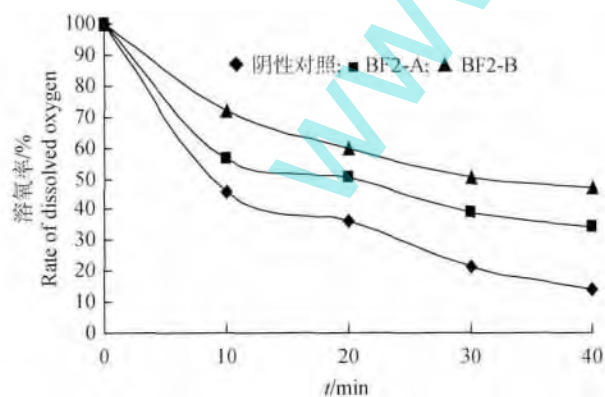


图 5 抗菌肽对细菌氧消耗的影响

Fig. 5 The effect of antimicrobial peptides on oxygen consumption of *E. coli*

2.6 抗菌肽作用细菌后对细胞产 ATP 的影响

加入抗菌肽后,细菌的呼吸作用受到抑制,那么其 ATP 的合成必然会受到抑制。抗菌肽对细菌细胞产 ATP 能力的影响如图 6 所示,BF2-A/B 处理后,伴随着呼吸受到抑制的同时,ATP 的含量急剧降低,其中 BF2-B 对 ATP 合成的抑制更强烈。

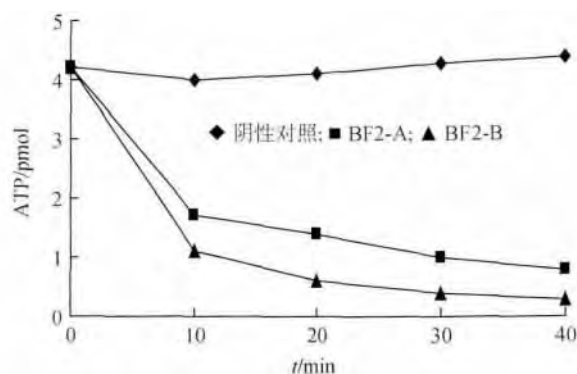


图 6 抗菌肽对细菌 ATP 生产的影响

Fig. 6 The effect of antimicrobial peptides on the ATP content of *E. coli*

3 讨论

抗菌肽的研究已有几十年的历史,而各国学者研究抑菌机理主要集中在膜作用机制上。分离自蟾蜍胃组织中的抗菌肽 Buforin II 能透过细胞膜,直接作用于胞内 DNA,达到杀菌目的。笔者以 Buforin II 的衍生肽 BF2-A 为母肽,在其结构特征基础上设计合成了一个新肽 BF2-B,研究发现 BF2-B 的抗菌活性比 BF2-A 强,杀菌也比 BF2-A 迅速^[13]。

笔者选取金黄色葡萄球菌为研究对象,研究比较了衍生肽 BF2-A/B 对基因组 DNA 的结合作用导致的抑菌机理。原子力显微镜观察和凝胶阻滞试验都证实 BF2-A/B 能够强烈结合基因组 DNA,并且 BF2-B 结合 DNA 的能力比 BF2-A 强。DNase I 足迹试验说明衍生肽趋向与金黄色葡萄球菌基因组 DNA 上的 2 个区段进行特异性结合,其中 1 个区段是 23S rRNA 基因上的 1 段保守序列。抗菌肽还能影响细胞的氧化磷酸化过程,显著抑制细菌的呼吸作用和 ATP 的合成,其中 BF2-B 的抑制比 BF2-A 更强烈,细菌的呼吸链是分布在细胞质膜上,在前期研究中我们知道抗菌肽 BF2-A/B 几乎不破裂细胞膜,推测它们对呼吸链的直接影响有限,因此呼吸作用的抑制可能是 BF2-A/B 进入细胞后,作用于电子传递链中某一种或几种成分,影响其功能。BF2-B 抑制呼吸作用更强,可能是它穿越质膜时对细胞膜渗透性增加,在一定程度上扰动了质膜上呼吸链的缘故。溶质的摄取,例如氨基酸、核苷酸、嘌呤等这些大分子合成的前体物的运输,需要提供包括 ATP 和质子动势这样的能量^[18]。而呼吸作用及其相偶联的 ATP 的产生受到抑制,会使得与能量需求相关的大分子合成前体物的吸收过程变得异常困难,那就进一步影响了蛋白和核酸的生物合成^[19]。

结合前期的试验结果分析,衍生肽 BF2-A/B 都不是破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜而杀菌的^[14],它们透过细胞膜进入细胞质,通过特异性结合基因组 DNA,并且抑制生物大分子的合成^[19]以及细胞呼吸作用和 ATP 合成,而实现抑菌作用。BF2-B 的结构使其对金黄色葡萄球菌细胞膜的穿膜效率更高,在胞内的累积更多,同时结合 DNA 的能力更强,抑制细菌的呼吸作用和 ATP 的合成更强烈。

4 结论

抗菌肽 BF2-A/B 通过渗透金黄色葡萄球菌细

胞膜进入细胞质后,特异性地结合基因组 DNA 上的 2 个区段,并抑制细胞呼吸作用和 ATP 合成而实现抑菌。BF2-B 结合 DNA 的能力更强,抑制细胞呼吸作用和 ATP 合成的能力更强,因此具有更强的抑菌活性。

参考文献:

- [1] BOMAN H G, NILSSON I, RASMUSON B. Inducible antibacterial defense system in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1972, 237(5352): 232-235.
- [2] YAO Y, VUONG C, KOCIANOVA S, et al. Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(6): 841-848.
- [3] NOVICK R P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(6): 1429-1449.
- [4] IMURA Y, NISHIDA M, OGAWA Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(5): 1160-1169.
- [5] HANCOCK R E, ROZEK A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 206(2): 143-149.
- [6] 王芳, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 组对 K562 癌细胞染色质 DNA 断裂作用的 SCGE 研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(1): 64-67.
- [7] PARK C B, KIM M S, KIM S C. A novel antimicrobial peptides from *bufo bufo gargarizans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218(2): 408-413.
- [8] PARK C B, KIM H S, KIM S C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide Buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244(1): 253-257.
- [9] KOBAYASHI S, CHIKUSHI A, TOUGU S, et al. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin2 [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(49): 15610-15616.
- [10] KOBAYASHI S, TAKESHIMA K, PARK C B, et al. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(29): 8648-8654.
- [11] UYTERHOEVEN E T, BUTLER C H, KO D, et al.

- Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin2 [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(12):1715-1718.
- [12] PARK C B, YI K S, MATSUZAKI K, et al. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15):8245-8250.
- [13] HAO G, SHI Y H, TANG Y L, et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2 [J]. *Peptides*, 2009, 30(8):1421-1427.
- [14] 郝 刚, 乐国伟, 施用晖, 等. 抗菌肽 Buforin II 衍生物对金黄色葡萄球菌细胞膜作用机制的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(7):1124-1130.
- [15] VOLCKE C, PIROTTON S, GRANDFILS C H, et al. Influence of DNA condensation state on transfection efficiency in DNA/polymer complexes: An AFM and DLS comparative study [J]. *J Biotech*, 2006, 125(1):11-21.
- [16] ZHANG L J, BENZ R, HANCOCK R E. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of α -helical peptides [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(25):8102-8111.
- [17] SKERLAVAJ B, ROMEO D, GENNARO R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactenecins [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(11):3724-3730.
- [18] KOSHLUKOVA S E, LLOYD T L, ARAUJO M W, et al. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(27):18872-18879.
- [19] 郝 刚, 施用晖, 马丹雅, 等. 抗菌肽 buforin II 衍生物抑制大肠杆菌大分子合成的研究 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(11):2057-2065.

(编辑 白永平)

www.spm.com.cn