

抗菌肽 Met-Ala-Lys 对铜绿假单胞菌细胞膜的作用机制

刘映君, 李素芬, 王琴, 刘祎帆

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510000)

摘要:以抗菌肽 Met-Ala-Lys (MAK) 和铜绿假单胞菌为研究对象, 采用 NPN 荧光探针法, 圆二色谱法以及原子吸收光谱测定铜绿假单胞菌细胞膜结构的变化, 探讨 MAK 对目标菌生长的影响作用机制。结果表明: 随着 MAK 对铜绿假单胞菌作用时间的增加, MAK 的二级结构尤其是无规则卷曲结构发生变化明显, 细胞内膜(吸附速率从 54.03%降至 27.33%)和外膜(荧光强度在前 30 min 持续增强, 30 min 后基本稳定在 45 左右)受到影响, 通透性明显增强, 导致钾离子(从处理 10 min 时迅速增加)和蛋白质泄漏量(从 4.65 $\mu\text{g/mL}$ 到 10.25 $\mu\text{g/mL}$)以及细胞膜的疏水性随之增加, 细胞表面膜电位发生变化。表明 MAK 能改变铜绿假单胞菌的表面特性, 抑制其生长, 进而起到抗菌作用。本研究为抗菌肽 MAK 的抗菌机理研究奠定一定的理论基础。

关键词: 抗菌肽; 铜绿假单胞菌; 细胞膜; 抗菌机理

文章编号: 1673-9078(2019)06-56-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.008

Mechanism of Antibacterial Peptide Met-Ala-Lys Affecting on the Cytomembrane of *Pseudomonas aeruginosa*

LIU Ying-jun, LI Su-fen, WANG Qin, LIU Hui-fan

(College of Light Industry and Food Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510000, China)

Abstract: The present study investigated the antibacterial effect of the peptide Met-Ala-Lys (MAK) on the structure of *Pseudomonas aeruginosa* based on the NPN fluorescence method, the circular dichroism spectroscopy analysis, and the level of potassium ions and protein were employed respectively to characterize the extracellular membrane permeability, the variation of secondary structure, and the cell surface hydrophobicity and its endometrial permeability induced by the MAK. The results showed that with the increase of time, the secondary-structure, specially the Random coil, of MAK changed, resulting in the leakage of potassium (getting rapidly from the first 10 min) and protein were significantly high (from 4.65 $\mu\text{g/mL}$ to 10.25 $\mu\text{g/mL}$), indicating that the inner (from 54.03% to 27.33%) and outer (increase rapidly in the first 30 min and basically stable at around 45 after 30 min) membrane permeability were changed, thus, MAK can change the surface characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* and contribute to the inhibition of bacterial growth. These results may provide some information for further study of antibacterial peptide, especially in the aspect of the mechanism of antibacterial peptide Met-Ala-Lys.

Key words: antibacterial peptide; *Pseudomonas aeruginosa*; cytomembrane; antibacterial mechanism

由于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。人们迫切地寻找能够代替传统抗生素的药物, 使得抗菌肽受到广泛的重视。目前, 全球科研人员对抗菌肽的作用机制、药物疗效、安全性等正进行深入研究^[1]。

抗菌肽(AMPs)又称宿主防御肽, 存在于从微生物

到人类的各种生命形式中, 是生物机体在抵御病原微生物的防御反应中所产生的一类抗微生物与一些恶性细胞的短肽^[2]。它具有广谱抗菌活性, 可以快速查杀靶标, 并且其中很多是纯天然的肽, 因此, 抗菌肽被广泛应用于治疗药物中。

兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C. Fisch)为兰科中石斛附属植物, 其主要化学成分包括蛋白质、糖类、联苄类、菲类等^[3], 是一种名贵的中药材, 广泛分布在我国广西、贵州和云南地区^[4]。有研究发现从豆腐乳中分离的菌株 L6 对兜唇石斛进行固态发酵^[5], 得到的粗多肽^[6]产率可达 18.23%±

收稿日期: 2019-01-23

基金项目: 广东省科技计划项目(2016A040402045); 广州市科技计划项目(201704030084)

作者简介: 刘映君(1998-), 女, 本科, 研究方向: 天然产物开发

通讯作者: 刘祎帆(1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物加工

0.064%^[7]。此后用 DEAE Sepharose-FF 阴离子交换层析的方法对此粗多肽进行分离纯化, 经过 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定, 得到一种具有抗氧化性的短肽 Met-Ala-Lys (以下简称“MAK”)。本研究选用 MAK 肽和铜绿假单胞菌作为研究对象, 研究 MAK 对铜绿假单胞菌细胞膜的抑制作用。

目前, 抗菌肽对致病菌的抑制作用机理具有以下几种假设: 瓦解细胞膜结构; 抑制胞内大分子的合成; 损伤细胞器; 抑制细胞内各种酶的活性等^[8]。本研究通过探讨 MAK 对细胞膜的作用机制, 从而为进一步探究 MAK 的抗菌机理提供理论基础, 对 MAK 抗菌机理的研究深远的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

兜唇石斛来源于云南省西双版纳傣族自治州勐海县, 由华南农业大学生命科学学院教授鉴定合格; 铜绿假单胞菌株从华南理工大学食品科学与工程实验室分离得到; 胰大豆胨液体培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; PBS 磷酸盐缓冲液, 北京雷根生物技术有限公司; 氯化钠, 上海泰坦化学有限公司; 考马斯亮蓝、琼脂粉, 齐云生物技术有限公司; 正十六烷, 上海麦克林生化科技有限公司; 十二烷基磺酸钠 (SDS)、邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)、N-苯基-1-萘胺 (NPN), 大连美仑生物技术有限公司。

1.1.2 主要设备

超净工作台, 上海跃欣实业有限公司, 型号 SZX; 高压灭菌锅, 上海博迅实业有限公司, 型号 SS-325; 低速离心机, 上海安亭科学仪器厂, 型号 TDL-2B; 超纯水系统, Millipore 公司, 型号 Academic A10; 双光束紫外可见分光光度计, TU-1900 型; 恒温振荡孵育器, 美国 ABSON 公司, TMC 型; 原子光谱仪 Perkin Elmer Nexion 公司, 型号 300; 圆二色谱仪 Chirascan Applied Photophysics 公司; 马尔文激光粒度仪 Malvern Zetasizer Nano 公司, 型号 Z; 高效液相色谱仪 SHIMADZU Inertsil 公司, 型号 ODS-SP(4.6 $\times$ 250 mm $\times$ 5 μ m); 荧光光度计, tecan Infinite 公司, 型号 200 pro; 质谱仪, waters 公司, 型号 2695; 恒温培养振荡器, 天津市欧诺仪器仪表有限公司, 型号 HNY-111B。

1.2 实验方法

1.2.1 MAK 的合成

参照郑少萌^[9]等人的方法并稍作修改, 利用 Fmoc

法进行合成, 具体实验步骤如下: 根据目标多肽的重量计算每种原料的重量后, 将 5 g 树脂放入 150 mL 反应器中, 加入 50 mL DCM 浸泡 2 h。浸泡后用 DMF 洗涤树脂, 然后抽干, 如此重复四次, 将树脂抽干。称取 0.02 mol Fmoc-Lys(tBu)-OH (C 端第一个氨基酸)、10 mL DCM 和 10 mL DIEA, 置于 30 $^{\circ}$ C 的摇床中反应 2 h, 用 50 mL 甲醇溶液封闭 (甲醇:DIEA:DCM=1:1:2) 30 min, 然后用 DMF 洗涤四次, 抽干。随后加入 20% 哌啶溶液 (哌啶/DMF=1:4), 脱去 Fmoc 保护基团, 再用 DMF 洗涤四次, 抽干。取少量树脂, 用茚三酮法检测, 若树脂有颜色, 说明脱保护成功。

称取 0.06 mol Fmoc-Ala(otbu)-OH (C 端第一个氨基酸)、20 mL HOBT 和 10 mL DIC, 置于 30 $^{\circ}$ C 的摇床中反应 1 h。取少量树脂检测, 用茚三酮法检测, 若树脂有颜色, 说明缩合不完全, 继续反应。若树脂为无色, 说明反应完全; 待反应完全后, 用 DMF 洗涤树脂四次, 抽干。随后加入一定量的 20% 哌啶 (哌啶/DMF=1:4), 放在脱色摇床上摇晃 20 min, 以此脱去树脂上的 Fmoc 保护基团。脱完保护后用 DMF 洗涤四次, 然后抽干检测保护是否脱去。取少量树脂用茚三酮法检测, 树脂有颜色, 说明脱保护成功。按照前述步骤使用 Fmoc-Met(otbu)-OH+HOBT+DIC 原料, 连接氨基酸。用切割试剂将多肽保护基团全部切除, 并从树脂上切割下来, 然后纯化。

1.2.2 MAK 的结构鉴定

本实验采用质谱仪对合成 MAK 进行结构鉴定, 质谱的条件如下:

溶解方法: 5% HAC+8% ACN+87% H₂O; 注入体积: 0.2 μ L; 电离方式: 离子电喷雾 (ESI) 模式; 偏离周期+4.5 kV; 鞘气温度 250 $^{\circ}$ C; 雾化气流量 1.5 L/min。

1.2.3 MAK 的纯度鉴定

通过高效液相色谱仪, 将目标肽段进行鉴定。在流速为 1 mL/min 的条件下, 以 0.1% 三氟乙酸水溶液和 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液作为洗脱剂, 进行洗脱, 处理后在 214 nm 下进行高效液相色谱检测。

1.2.4 菌种的培养

将斜面保藏的铜绿假单胞菌接种到 200 mL 的胰大豆胨液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C, 摇床中培养 24 h, 将菌种活化。活化后的细菌接种到胰大豆胨培养基 (平板) 中, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。挑取单菌落于 4 mL 胰大豆胨液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C, 摇床中培养 14 h。将 1 mL 已培养的单菌落接种进已经稀释 100 倍的胰大豆胨液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C, 摇床中培养 6 h。枯草杆菌和大肠杆菌的培养方法与前述一致。

1.2.5 MAK 抑菌效果

将不同剂量的铜绿假单胞菌、枯草杆菌和大肠杆菌加入融化并使温度降至 50 ℃左右的定量 MH 琼脂中,制成含不同递减浓度抗菌药物的平板^[10],进行受试菌,培养观察细菌生长情况,以抑制细菌生长的琼脂平板所含最低药物浓度为 MIC。

1.2.6 MAK 对细菌细胞表面疏水性的影响

首先将铜绿假单胞菌菌液用 4000 r/min 离心机离心 15 min 后,用 PBS 溶液洗涤对数期的铜绿假单胞菌菌体,加入硝酸钠溶液(浓度为 0.1 mol/L)重悬,使菌液浓度达到 10^8 CFU/mL。分别移取浓度为 $1\times\text{MIC}$ 、 $1/2\times\text{MIC}$ 、 $1/4\times\text{MIC}$ 、 $1/8\times\text{MIC}$ 的 MAK 溶液,与铜绿假单胞菌悬液等体积混合,对照组为等量 PBS 溶液,放在 37 ℃恒温 150 r/min 震荡培养 30 min 后用分光光度计于 450 nm 处测定 OD 值(记吸光值为 A_0)。吸取体积为 1.2 mL 的菌悬浮液加入 200 μL 的正十六烷,在 25 ℃下用摇床混合处理 2 min 将两者混合均匀。静置 15 min 使菌悬液和有机相完全分层,吸取水相与 405 nm 处测定其吸光度(记录吸光值为 A_1)。铜绿假单胞菌表面疏水性可通过以下公式来表示:

$$\text{吸附率}\% = 100 \times (1 - A_1/A_0)$$

1.2.7 MAK 对细菌细胞外膜渗透性的影响

MAK 对细菌细胞外膜渗透性的影响是通过荧光探针 NPN 测定的。将培养 12 h 的铜绿假单胞菌液转移到胰酪大豆胨培养基中培养至于 600 nm 处 OD 值为 0.5~0.6 的环境中,用 pH 为 7.24 的 HEPES 缓冲液清洗,重悬于 5 mM 的 pH 为 7.24 HEPES 缓冲液中至吸光度为 0.5。取 3 mL 悬液,加入 60 μL 浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 NPN(正苯基萘胺)溶液,30 s 后加入浓度为 $1\times\text{MIC}$ 的 MAK 溶液。在激发波长为 315 nm 和发射波长为 400 nm 条件下,用荧光光度计测量每孔的相对荧光强度,测定时间为 0、2.5、7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5、25、27.5、30 h。阳性对照和阴性对照分别为等量 Triton-X-100 溶液和 HEPES 溶液。

1.2.8 MAK 对细菌细胞内膜渗透性的影响

将铜绿假单胞菌菌液培养至生长对数期,取 1 mL 在 4000 r/min 转速离心 15 min 后取上清液,用无菌生理盐水复洗两次。将离心洗涤后的菌液加入体积为 10 mL 的 M9 乳糖培养基中,于 37 ℃摇床中培养 8 h 后离心、洗涤,重悬于 β -半乳糖苷酶缓冲溶液中,使其在 405 nm 处 OD 值约为 0.2,备用。移取 100 μL 浓度为 1 mg/mL 的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 和 100 μL $1\times\text{MIC}$ 浓度的抗菌肽 MAK 溶液均匀混合,水浴锅水浴于 37 ℃的条件下震荡培养,同时设阴性对照为 PBS,阳性对照为 Tirtion-X-100。每隔 1 h 测

定一次,记录五次数据。

1.2.9 MAK 对细菌细胞内 K^+ 的泄漏影响

分别用浓度为 1 MIC 的 MAK 溶液与 1×10^6 CFU/mL 的铜绿假单胞菌溶液混合在一起,在 37 ℃的条件下培养一定的时间。将培养后的悬液于 4000 r/min 离心 10 min,用原子光谱仪对上清液的 K^+ 浓度变化情况进行测定,每隔 10 min 记录一次,记录 5 次。

1.2.10 MAK 作用于细菌细胞膜时二级结构的变化

将 MAK 用 30 mmol/L SDS 溶液配置 0.2 mg/mL 的溶液,在比色皿中加入一定体积的肽溶液,用圆二色谱仪对对照品和样品于 190~250 nm 远紫外扫描,扫描带宽为 1.0 nm,速度为 50 nm/min。对扫描后的图谱用软件 (CDNN) 进行减噪处理并对对照品和样品的二级结构进行拟合计算。

1.2.11 MAK 对细菌细胞表面电位的影响

以无菌水处理为对照组,在 pH 为 6.5 的条件下用 MAK 处理的铜绿假单胞菌。用马尔文激光粒仪测定其表面电荷的变化,每隔 10 min 记录一次。

1.2.12 可溶性蛋白的测定

本实验利用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。以无菌水为对照组,用 0.5% MAK 溶液处理 CFU 约为 9 log 的铜绿假单胞菌溶液。菌液于震荡速度为 150 r/min,温度为 37 ℃的震荡培养箱中培养,每隔 1 h 进行一次取样(取样次数为 6 次),于 4000 r/min 的转速下迅速离心,测定上清液蛋白含量。

1.2.13 数据分析

以上所有实验设 3 个平行,实验结果用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。采用美国 IBM 公司的 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果与讨论

2.1 MAK 的鉴定

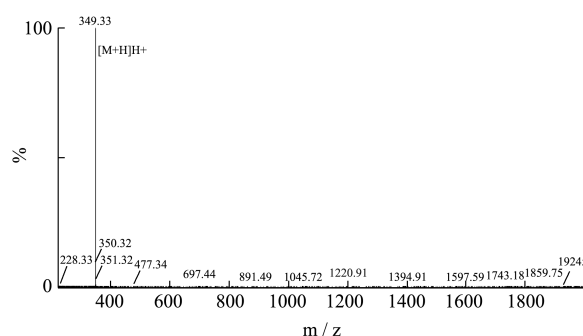


图 1 MAK 质谱图

Fig.1 MS Spectrum of MAK

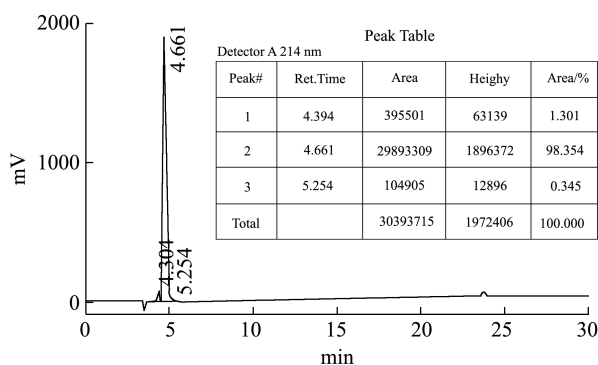


图2 MAK 色谱图

Fig.2 Chromatogram of MAK

经过图 1 的质谱分析可知, MAK 相对分子质量为 348.46。经高效液相色谱法处理后, 可得其色谱图, 由图 2 可见只有一个波峰, 面积达到 98.35%, 即得率为 98.35%, 合成的 MAK 纯度很高。

2.2 MAK 的抑菌效果

实验验证, MAK 只对铜绿假单胞菌具有良好的抑菌效果, 而对大肠杆菌和枯草杆菌没有抑菌作用。MAK 对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)为 48.75 mg/mL。

表 1 MAK 对三种菌的最小抑菌浓度

Table 1 MIC of MAK

致病菌种类	MAK MIC/(mg/mL)
铜绿假单胞菌	48.75
大肠杆菌	NA ^a *
枯草杆菌	NA ^a

注: *NA^a 表示本实验中的相关检测没有发现其具有抑菌作用。

2.3 MAK 对细菌细胞表面疏水性的影响

正十六烷是一种有机相, 铜绿假单胞菌表面对有机相和水相的吸附率不同^[10], 因此, 本实验采用 BATH 法, 选用正十六烷为吸附化合物, 根据铜绿假单胞菌对正十六烷的吸附率的改变, 可得出铜绿假单胞菌细胞表面疏水性变化情况, 从而分析 MAK 对铜绿假单胞菌细胞表面疏水性的影响。

由图 3 可看出, 对照组的值(起始值)为 54.03%, 经过 MAK 处理后, 1 MIC 值降至 27.33%。随着 MAK 溶液浓度的不断增加, 铜绿假单胞菌细胞对正十六烷的吸附率呈下降趋势。这表明 MAK 浓度越大, 铜绿假单胞菌细胞表面的疏水性越小。

细胞表面疏水位点主要是蛋白质脂类、糖脂类等^[11], 导致这一结果的原因可能是由于 MAK 与铜绿假单胞菌细胞表面相互作用, 吸引电负性基团造成重排,

从而导致铜绿假单胞菌细胞表面电负性增强, 疏水性下降^[12]。因此 MAK 与细胞膜的结合以及抑菌机理可能与其诱导细胞表面的疏水性有关^[13]。

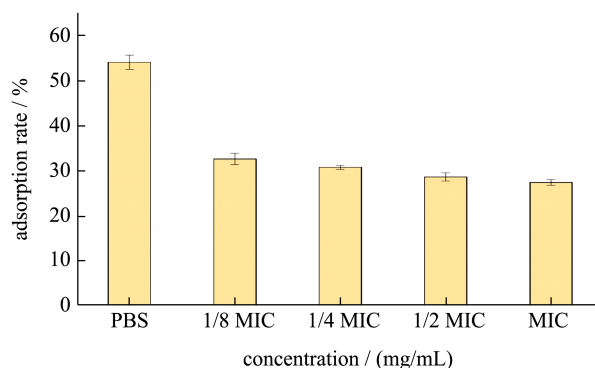


图3 抗菌肽 MAK 对铜绿假单胞菌细胞表面疏水性的影响

Fig.3 The effect of peptide MAK on the cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas aeruginosa*

2.4 MAK 对细菌细胞外膜渗透性的影响

NPN 是一种疏水性的荧光物质, 当 NPN 处于水环境时几乎没有荧光性, 但当其处于疏水性介质中的时候, 就会显现出一定的荧光强度^[14]。本实验使用 NPN 法测定 MAK 对铜绿假单胞菌细胞外膜渗透性影响, NPN 在此作为一种荧光探针。正常细胞的细胞膜对外部物质具有一定的选择透过性, 一般疏水性物质和大分子物质会被排除在外, 当细胞受到外部侵扰或损伤时, 细胞膜的选择透过性被破坏, 外部物质容易进入细胞。此实验通过 NPN 荧光强度的变化来观察 MAK 对细菌细胞外膜渗透性的影响^[15]。

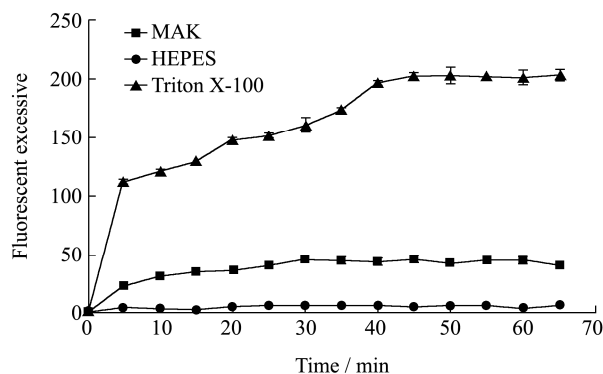


图4 抗菌肽 MAK 对铜绿假单胞菌细胞外膜渗透性的影响

Fig.4 The effect of peptide MAK on the outer membrane permeation of *Pseudomonas aeruginosa*

由图 4 可以看出, MAK 作用于铜绿假单胞菌细胞时, NPN 荧光强度在前 30 min 持续增强, 30 min 后荧光强度基本稳定在 45 左右。此外, 阳性对照组 Triton-X-100 荧光强度随时间的增加而增大, 荧光强度与作用时间呈正比关系。而对于没有加入 MAK 肽的阴性对照组, 其荧光值基本为 0.5 左右, 不随时间

发生变化。由此可知,抗菌肽 MAK 会造成铜绿假单胞菌细胞外膜损伤,从而引起细胞外膜渗透性增大,使其通透性增强。徐灿等人的报道中指出^[16],试验菌株在 YM30 黑色素(一种抗菌物质)处理后,荧光强度随黑色素浓度的增加而增加,这与我们的实验结果一致。

2.5 MAK 对细菌细胞内膜渗透性的影响

α -半乳糖苷酶是一种催化 α -D-半乳糖苷末端非还原性 α -D-半乳糖残基水解的酶,其水解乳糖后生成一种黄色的产物,因此可以通过颜色的变化来判断这种酶的活性。当细菌细胞被乳糖诱导时,便会产生这种酶,本实验使用 β -D-半乳糖苷(ONPG)作为乳糖的替代物^[17]。当细胞受到侵害时,细胞膜的通透性发生改变,ONPG 会迅速进入细胞内,诱导细胞产生半乳糖苷酶对其进行分解,产生黄色产物,使反应体系的 OD 值迅速升高,我们可以通过反应体系 OD 值的改变来观察 MAK 对铜绿假单胞菌细胞内膜的影响。

如图 5 所示,MAK 作用于铜绿假单胞菌细胞时,反应体系的 OD 值呈上升趋势,在时间达到 3 h 后,OD 值基本稳定在 0.7 左右。此外,阳性对照组 Triton-X-100 的 OD 值随时间的增加而迅速增大,OD 值与作用时间基本呈现正比关系。而对于没有加入 MAK 肽的阴性对照组,其 OD 值基本为 0.6 左右,不随时间发生变化。由此可知,抗菌肽 MAK 会造成铜绿假单胞菌细胞内膜损伤,从而引起细胞内膜渗透性增大,使其通透性发生一定的改变。

在赵广旭等人的研究中^[18],使用 α -螺旋型多肽处理大肠杆菌细胞,随着多肽浓度的增加,ONPG 进入细胞也明显增多,乳酸脱氢酶在刺激下呈迅速上升的趋势,本研究与此结果一致。说明此肽通过破坏细胞膜的方式进入细胞使细胞内容物外流,达到杀死细胞的效果。

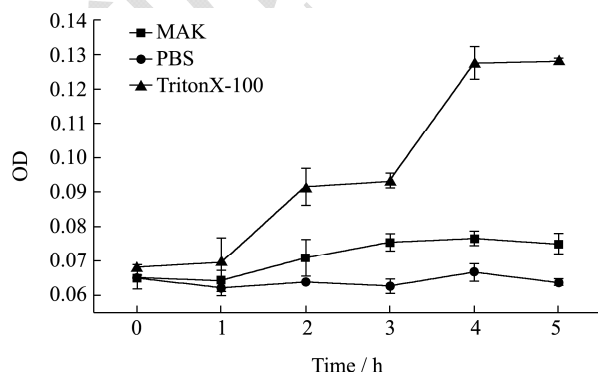


图 5 抗菌肽 MAK 对铜绿假单胞菌细胞质膜通透性的影响

Fig.5 The effect of peptide MAK on the cytoplasmic membrane permeabilization of *Pseudomonas aeruginosa*

2.6 MAK 对细菌细胞内 K^+ 的泄漏影响

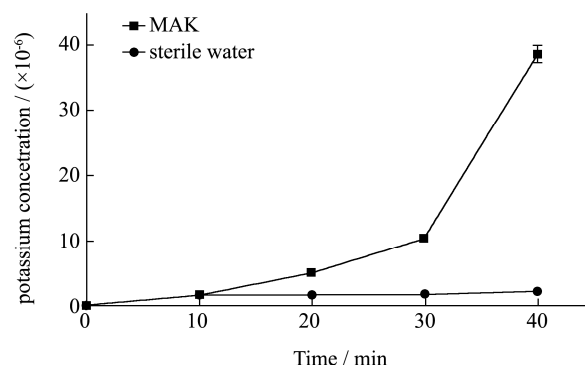


图 6 抗菌肽 MAK 诱导铜绿假单胞菌细胞内钾离子释放的数量

Fig.6 Amount of potassium ion released by MAK from *Pseudomonas aeruginosa*

K^+ 的泄漏情况可反应细胞膜通透性的变化程度^[19],图 6 表示 MAK 处理过程中,铜绿假单胞菌细胞钾离子泄漏浓度的变化情况。 K^+ 泄漏量从处理 10 min 时迅速增加,随着时间的增加,钾离子的浓度呈指数曲线的趋势快速上升,可见 MAK 对铜绿假单胞菌细胞膜的透化作用的影响十分显著。

钾离子的泄漏是离子泄露的一个典型代表,其泄漏的程度也说明抗菌肽 MAK 作用于铜绿假单胞菌会造成其内部其他离子的泄露。从乳酸菌中筛选的抗菌肽 T1 和 Q7 作用于李斯特菌时,钾离子快速泄漏^[20]。细胞膜上的钾离子通道受损,泄漏钾离子,破坏细胞的 ATP 泵运行,这些离子通道在必须的生理过程中起着十分重要的作用,一旦被破坏将使离子浓度无法达到平衡,膜功能受损^[21]。MAK 与细胞膜的结合过程以及抑菌活性的发挥可能与其损伤细胞膜上离子通道有关。

2.7 MAK 作用于细菌细胞膜时二级结构的变化

MAK 二级结构的变化与其对铜绿假单胞菌细胞膜的作用活性是相互联系的^[22]。圆二色光谱是应用最为广泛的测定蛋白质二级结构,研究稀溶液中蛋白质构象的一种快速、简单、较准确的方法^[23]。而且测定方法快速简便,对构象变化灵敏,广泛应用于蛋白质的构象研究中。本实验利用圆二色谱法,检测出 MAK 处于 PBS 溶液体系和 SDS 疏水环境中的二级结构。从表 2 可知,当 MAK 处于 PBS 溶液体系中时其二级结构含量分别为 α -螺旋(7.5%);反平行(95.3%);平行(14%); β -转角(29%);无规则卷曲(32.5%);处于 SDS 疏水环境中时其二级结构含量分别为 α -螺旋

(5.3%); 反平行(95.8%); 平行(20%); β -转角(27%); 无规则卷曲(49.8%)。结果表明, MAK 处于这两种环境中时, 二级结构产生差异, 其中无规则卷曲结构变化最大。

在陶立国等人的研究中^[24], 淀粉多肽 KKKGLMD

DVVLA 作用后二级结构信号强度明显增强, 且 β 结构消失, 其他二级结构比例发生变化, 本实验结果与其具有相似的变化。MAK 的二级结构的变化反映了其对铜绿假单胞菌细胞膜作用的活性变化^[25], 对机理的进一步探究有重要意义。

表 2 抗菌肽 MAK 的二级结构含量

Table 2 Secondary structure prediction of peptide MAK

抗菌肽 MAK 在不同溶液体系中	二级结构
MAK 在 PBS 缓冲液中	α -螺旋(7.5%), 反平行(95.3%), 平行(14%), β -转角(29%), 无规则卷曲(32.5%)
MAK 在 SDS 缓冲液中	α -螺旋(5.3%), 反平行(95.8%), 平行(20%), β -转角(27%), 无规则卷曲(49.8%)

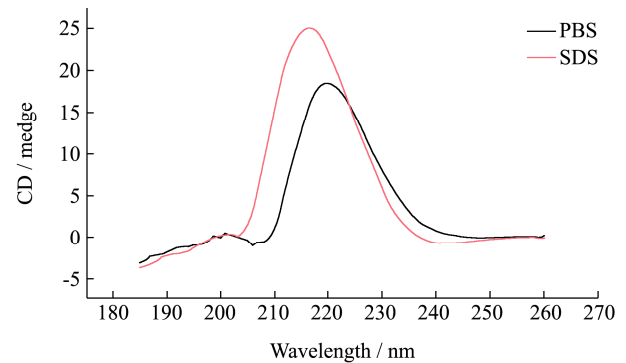


图 7 抗菌肽 MAK 在 PBS 缓冲液和 SDS 溶液中的 CD 光谱
Fig.7 Circular dichroism spectra of peptide MAK in buffer and in the presence of 30 mM SDS

Note: All spectra were recorded at a peptide concentration of 8 M at room temperature.

2.8 MAK 对细菌细胞表面电荷的影响

如图 8 所示, 纵坐标表示用 MAK 肽处理后, 通过马尔文激光粒度仪测量得到的铜绿假单胞菌细胞的表面电位, 其对照组为等量无菌水。可以看出, 经 MAK 处理, 膜电位的电负性随着时间的增加而减小, 而经无菌水处理的对照组电负性则呈上升趋势, 表明 MAK 处理对铜绿假单胞菌细胞膜电位影响严重。

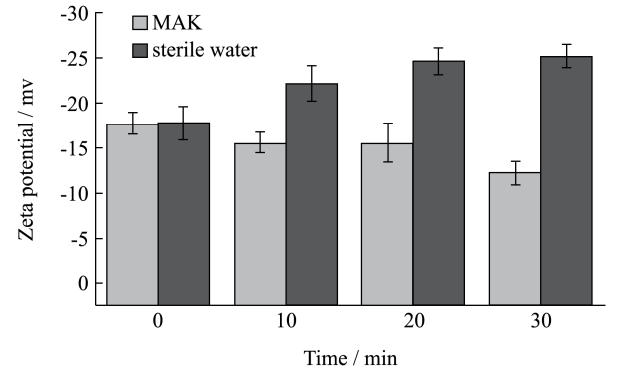


图 8 抗菌肽 MAK 处理后对铜绿假单胞菌细胞表面电荷的影响
Fig.8 The effect of peptide MAK on the surface-charges of *Pseudomonas aeruginosa*

由于微生物细胞表面含有大量的脂多糖、糖蛋白

等, 带有大量的负电基团, 因此细胞表面电荷为负, 由于抗菌肽 MAK 为阳离子肽, 干扰了细胞膜电位, 使其通透性发生改变^[26]。孙杰等人通过检测 ATA 处理细菌前后膜电位变化探究其抗菌机理^[27], 发现随着 ATA 浓度的增加, 相对膜电位迅速降低, 推测膜电位的迅速降低导致细菌细胞正常生理功能受损, 本研究与其结果一致。

2.9 可溶性蛋白的测定

蛋白质是机体三大营养素之一, 也是一切细胞的重要组成成分, 可溶性蛋白的含量可反应细胞的健康状态^[28]。如图 9 所示, 纵坐标为可溶性蛋白的泄漏量, 可以看出随着时间的增加, MAK 和无菌水处理后的铜绿假单胞菌细胞可溶性蛋白的泄漏量均有增加, 但无菌水对照组的增加量不大, 而 MAK 处理后的可溶性蛋白泄漏量从一开始的 4.5 $\mu\text{g/mL}$ 左右到 6 h 时的 10 $\mu\text{g/mL}$, 迅速明显增加。说明 MAK 对铜绿假单胞菌作用后其可溶性蛋白泄漏严重。

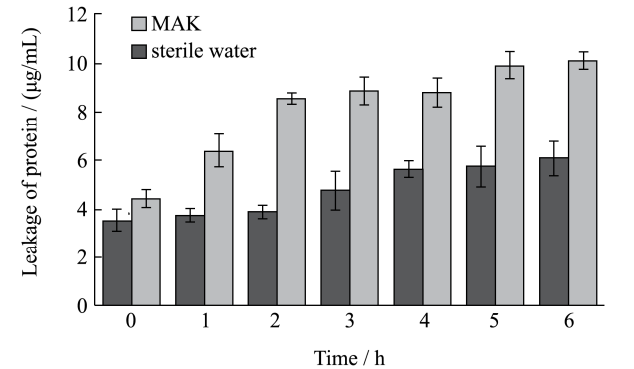


图 9 MAK 处理后铜绿假单胞菌蛋白渗漏情况
Fig.9 Leakage of protein from *pseudomonas aeruginosa* cells treated with MAK

在常丽等人的研究中发现^[29], 季磷盐改性聚丙烯纤维作用于细菌后, 使细菌细胞膜的通透性增加, 蛋白质的泄漏量随作用时间的延长而逐渐增加, 与本实验的结果一致。MAK 对铜绿假单胞菌处理后, 影响其细胞膜通透性, 使离子以及大分子物质等流出,

使细菌不能进行正常的生理代谢活动,甚至导致细菌的死亡。

3 结论

本研究以 Met-Ala-Lys (MAK) 为研究对象,系统研究了经其处理后铜绿假单胞菌生成情况的作用规律。结果表明经 MAK 处理后,铜绿假单胞菌细胞内外膜的渗透性改变,钾离子和可溶性蛋白的溶出增加,表明 MAK 对铜绿假单胞菌的生长具有抑制作用,表现出一定的抗菌作用,本研究为进一步研究 MAK 的抗菌机理具有一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] 李冠楠,夏雪娟,隆耀航,等.抗菌肽的研究进展与应用[J].动物营养学报,2014,26(1):17-25
LI Guan-nan, XIA Xue-juan, LONG Yao-hang, et al. Research progress and application of antimicrobial peptides [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(1): 17-25
- [2] 宋宏霞,曾名勇,刘尊英,等.抗菌肽的生物活性及其作用机理[J].食品工业科技,2006,27(9):185-197
SONG Hong-xia, ZENG Ming-yong, LIU Zun-ying, et al. Biological activity and mechanism of antimicrobial peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(9): 185-19
- [3] Ng T B, Jingyi Liu, Jack Ho Wong, et al. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(5): 1795-1803
- [4] 李桂琳,白燕冰,白学慧,等.兜唇石斛扦插繁殖试验[J].热带农业科技,2011,34(2):32-34
LI Gui-lin, BAI Yan-bing, BAI Xue-hui, et al. Experiment of *Dendrobium aphyllum* cuttage propagation [J]. Science and Technology of Tropical Agriculture, 2011, 34(2): 32-34
- [5] Liu Huifan, Ma Juanjuan, Wu Hui. Detoxifying effects of ultrafiltration fractions of *Dendrobium aphyllum* peptides on chemical and AAPH-induced oxidative stress [J]. RSC Adv, 2017, 7: 48913-48924
- [6] 刘祎帆.兜唇石斛免疫活性多糖及抗氧化肽的结构鉴定及功能表征[D].广州:华南理工大学,2018
LIU Hui-fan. The Identification of structure and characterization of immunoregulatory polysaccharide and antioxidative peptides isolated from *Dendrobium aphyllum* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [7] 宋丽雅,倪正,樊琳娜,等.花椒抑菌成分提取方法及抑菌机理研究[J].中国食品学报,2016,16(3):125-130
SONG Li-ya, NI Zheng, FAN Nin-na, et al. Study on the extraction method and antibacterial mechanism of Chinese prickly ash [J]. Chinese Journal of Food Science, 2016, 16(3): 125-130
- [8] 汪陈洁.乳酸对常见食源性致病菌的抗菌活性与作用机理[D].武汉:华中农业大学,2014
WANG Chen-jie. Antimicrobial activity and mode of action of lactic acid against common food-borne pathogens [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014
- [9] 郑少萌.四种多肽的合成和分离纯化的基础研究[D].北京:首都师范大学,2014
ZHENG Shao-meng. Basic research on synthesis isolation and purification of four polypeptides [D]. Beijing: Capital Normal University, 2014
- [10] 彭博,郭中敏,陆家海.人工合成抗菌肽的常用方法及应用前景[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):176-183
PENG Bo, GUO Zhong-min, LU Jia-hai, et al. Common methods and application prospect of synthetic antimicrobial peptides [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(3): 176-183
- [11] 赵晴,张甲耀,陈兰洲,等.疏水性石油烃降解菌细胞表面疏水性及降解特性[J].环境科学学报,2005,26(5):132-136
ZHAO Qing, ZHANG Jia-yao, CHEN Lan-zhou, et al. Hydrophobicity and degradation characteristics of cell surface of hydrophobic oil-hydrocarbon degrading bacteria [J]. Journal of Environmental Sciences, 2005, 26(5): 132-136
- [12] 孙宜君.螺旋藻抗菌肽的纯化鉴定及其抑菌机理的研究[D].北京:北京林业大学,2016
SUN Yi-jun. Purification characterization and mechanism of action of an antibacterial peptide from *Spirulina platensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016
- [13] 侯利霞,翟培,施用晖,等.家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性影响及其作用机理的研究[J].微生物学通报,2007,34(3):434-437
HOU Li-xia, ZHAI Pei, SHI Yong-hui, et al. Effects of *Housefly* antimicrobial peptides on bacterial cell surface characteristics and their mechanism of action [J]. Journal of Microbiology, 2007, 34(3): 434-437
- [14] 丁闰蓉.培养基添加剂对重组大肠杆菌胞外生产重组 α -环糊精葡萄糖基转移酶的影响[D].无锡:江南大学,2009
DING Run-rong. Effect of medium additives on extracellular production of recombinant α -cyclodextrin glucose transferase in *E. coli* [D]. Wuxi: Southern Yangtze University, 2009
- [15] Huifan Liu, Ye Hongji, Sun Chongzhen et al. Antioxidant activity in HepG2 cells, immunomodulatory effects in RAW

- 264.7 cells and absorption characteristics in Caco-2 cells of the peptide fraction isolated from *Dendrobium aphyllum* [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(9): 2027-2036
- [16] 徐灿.粒毛盘菌黑色素及其衍生物结构、生物活性与作用机制[D].合肥:合肥工业大学,2017
- XU Can. Structure biological activity and mechanism of melanin and its derivatives [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017
- [17] 陈玉洁.酸马奶提取 *Kluyveromyces marxianus* 代谢抗菌复合物对致病性大肠杆菌的抑菌和细胞表面特性的影响[J].微生物学通报,2015,42(4):683-689
- CHEN Yu-jie. Effect of *Kluyveromyces marxianus* metabolic antibacterial complex extracted from acid mare milk on bacteriostasis and cell surface characteristics of pathogenic *Escherichia coli* [J]. Journal of Microbiology, 2015, 42(4): 683-689
- [18] 赵广旭.基于疏水性和螺旋性对膜活性多肽的设计与活性研究[D].长春:吉林大学,2017
- ZHAO Guang-xu. Design and activity study of membrane active polypeptides based on hydrophobicity and helicity [D]. Changchun: Jilin University, 2017
- [19] 陶凤云,张新妙,俞军,等.茶树油抗菌作用机理研究进展[J].中国抗生素杂志,2006,31(5):261-266
- TAO Feng-yun, ZHANG Xin-miao, YU Jun, et al. Research progress on antibacterial mechanism of tea tree oil [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(5): 261-266
- [20] 刘辉.抑制耐冷菌的乳酸菌抗菌肽筛选及其结构和抗菌机理研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2016
- LIU Hui. Screening structure and antibacterial mechanism of antimicrobial peptides from *Lactic acid bacteria* inhibiting cold-resistant bacteria [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016
- [21] 李苏宁,吴惊香,丁典,等.胰岛细胞 ATP 敏感的钾离子通道的结构[J].科学新闻,2018,546(4):34
- LI Ning-ning, WU Jing-xiang, DING Dian, et al. Structure of atp-sensitive potassium channels in islet cells [J]. Science News, 2018, 546(4): 34
- [22] 孙宜君.螺旋藻抗菌肽的纯化鉴定及其抑菌机理的研究[D].北京:北京林业大学,2016
- SUN Yi-jun. Purification characterization and mechanism of action of an antibacterial peptide from *Spirulina platensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016
- [23] 林凯蕾.圆二色光谱预测蛋白质二级结构组成方法评析[D].上海:复旦大学,2012
- LIN Kai-lei. Evaluation and analysis on the method of circular dichroism to predict protein secondary structure composition [D]. Shanghai: Fudan University, 2012
- [24] 陶立国.人工设计多肽的结构及其抗菌机理研究[D].无锡:江苏大学,2016
- TAO Li-guo. Structure and antibacterial mechanism of artificially designed polypeptides [D]. Wuxi: Jiangsu University, 2016
- [25] 韩宇鹏,杨静静,汪薛良,等.采用圆二色谱和傅立叶变换红外光谱法研究糖化与煮沸过程中蛋白质 Z 的二级结构变化[J].啤酒科技,2015(11):56-61
- HAN Yu-peng, YANG Jing-jing, WANG Xue-liang, et al. Study on secondary structure changes of protein Z during saccharification and boiling by circular dichrography and Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Beer Science and Technology, 2015, 11: 56-61
- [26] 舒展,张毅,谢虹忆,等.硅酸盐黏土矿物在抗菌方面研究进展[J].材料工程,2018,46(4):23-30
- SHU Zhan, ZHANG Yi, XIE Hong-yi, et al. Advances in research on antibacterial properties of *Silicate clay Minerals* [J]. Material Engineering, 2018, 46(4): 23-30
- [27] 孙杰.Ag/TiO₂ 纳米材料的制备及抗菌、抗螨性能和机理研究[D].深圳:深圳大学,2017
- SUN Jie. Preparation of Ag/TiO₂ nanocomposites and its antibacterial and antimite performance and mechanism [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2016
- [28] 曾嵘,夏其昌.蛋白质组学研究进展与趋势[J].中国科学院院刊,2002,3(3):17-25
- ZENG Rong, XIA Qi-chang. Advances and trends in proteomics research [J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2002, 3(3): 17-25
- [29] 常丽.季磷盐改性聚丙烯腈纤维及其抗菌性能与机理研究[D].长沙:湖南大学,2016
- CHANG Li. Study on The synthesis, antimicrobial activities and mechanism of polyacrylonitrile fibers modified with quaternary phosphonium salts [D]. Changsha: Hunan: Hunan University, 2016