

新型牛乳铁蛋白衍生肽KW-WK的生物活性及其稳定性

王海梅¹, 李盈盈¹, 侯俊财^{1*}, 姜成刚², 李东飞¹, 卢佳音¹, 赵悦含¹, 逢诗玥¹

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:以牛乳铁蛋白肽片段LFcinB₁₈₋₂₈为母肽,在保留其高电荷、强疏水性的基础上,依据对称结构设计理念,引入精氨酸和色氨酸替换,设计出新型抗菌肽KWRRWQWRRWK-NH₂(KW-WK)。采用圆二色谱法、微量稀释法、噻唑蓝法等方法分析KW-WK的二级结构、抑菌活性、溶血活性、细胞毒性及稳定性。结果表明,KW-WK肽在模拟水环境中呈无规卷曲状,在模拟细胞膜环境中,则呈 α -螺旋结构;KW-WK肽的抑菌性强,最小抑菌浓度为4~128 $\mu\text{mol/L}$;溶血率低,当肽浓度为256 $\mu\text{mol/L}$ 时,其溶血率小于5%;细胞毒性小;治疗指数为9.14,细胞选择性高;热稳定性好,100 $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h后仍保持较强的抑菌活性,酶稳定性较LFcinB₁₈₋₂₈母肽有极大的提高。因此,新型抗菌肽KW-WK在食品、医药和畜牧等领域都显示出巨大的应用潜力。

关键词: KW-WK肽; 抑菌活性; 溶血活性; 细胞毒性; 稳定性

Biological Activity and Stability of New Peptide Derivative KW-WK from Bovine Lactoferricin

WANG Haimei¹, LI Yingying¹, HOU Juncai^{1*}, JIANG Chenggang², LI Dongfei¹, LU Jiayin¹, ZHAO Yuehan¹, PANG Shiyue¹

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: This study designed a new anti-microbial peptide KWRRWQWRRWK-NH₂ (KW-WK) with the fragment of bovine lactoferricin LFcinB₁₈₋₂₈ as parent peptide. Apart from retaining the high charge and strong hydrophobicity of the parent peptide, arginine (R) and tryptophan (W) replacement was introduced to design this anti-microbial peptide based on the concept of symmetrical structure. The secondary structure, antibacterial activity, hemolysis activity, cell toxicity and stability of KW-WK were determined by circular dichroism spectroscopy, broth microdilution and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method. The results showed that KW-WK existed in a random coil structure in aqueous solution. However, it was α -helical in the simulated environment of cell membrane. The minimal inhibitory concentration (MIC) of KW-WK ranged from 4 to 128 $\mu\text{mol/L}$, suggesting that its bacteriostatic activity was strong. The hemolysis rate was less than 5% when the concentration of KW-WK was 256 $\mu\text{mol/L}$. This result showed that its hemolysis activity was low. The therapeutic index of KW-WK was 9.14, and its cytotoxicity was relatively low. Thus, its cell selectivity was relatively high. In addition, after heat treatment 100 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, KW-WK still possessed rather high antibacterial activity. The enzymatic stability of KW-WK was greatly improved as compared to LFcinB₁₈₋₂₈. Therefore, the new anti-microbial peptide KW-WK has shown a great application potential in the fields of food, medicine, livestock etc.

Keywords: KW-WK peptide; antibacterial activity; hemolytic activity; cytotoxicity; stability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820009

中图分类号: Q511

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 20-0057-06

引文格式:

王海梅, 李盈盈, 侯俊财, 等. 新型牛乳铁蛋白衍生肽KW-WK的生物活性及其稳定性[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 57-62. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820009. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Haimei, LI Yingying, HOU Juncai, et al. Biological activity and stability of new peptide derivative KW-WK from bovine lactoferricin[J]. Food Science, 2018, 39(20): 57-62. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820009. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-08-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0400605)

第一作者简介: 王海梅(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: Wanghaimei66@126.com

*通信作者简介: 侯俊财(1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: jchou@neau.edu.cn

抗生素的发现和应用为治疗感染性疾病提供了非常有效的途径,也促进了畜牧业快速发展。尽管目前抗生素治疗仍然是应对人类及动物微生物感染的首选方法,但是,由于人类长期滥用抗生素,导致其耐药性和药物残留等问题日益严重^[1]。因此,研发出广谱高效、不易产生耐药性、低残留的新型抗菌剂成为目前的研究重点^[2],而抗菌肽是最有可能的选择之一。抗菌肽是一类生物体中普遍存在并具有广谱抗微生物活性的小分子肽(10~50个氨基酸),是天然免疫系统的重要组成部分,具有广谱抗菌性^[3-4]。抗菌肽通过膜裂解机制抑杀细菌,不易产生耐药性,且组成它们的氨基酸经过新陈代谢被吸收利用,不易残留。但是,大多数天然抗菌肽体外活性不高,生产成本较高,对真核细胞有一定的毒性。为解决上述问题,对天然抗菌肽进行改造或人工设计无疑是最佳的选择。

牛乳铁蛋白肽(LfcinB)来源于牛乳铁蛋白,是一种由25个氨基酸残基(FKRRWQWRMKKLGAPSITCVRRF-NH₂)组成的含有一个二硫键的环形抗菌肽。虽然LfcinB的抑菌性显著优于其他来源的乳铁蛋白肽,但是,与抗生素相比LfcinB的抑菌性还是不够理想。LfcinB的片段LfcinB₁₈₋₂₈(KRRWQWRMKK-NH₂)仅含有11个氨基酸残基,不仅保留其抑菌性,而且无溶血性,是抗菌肽分子设计的理想模板。因此,本研究借鉴小分子阳离子抗菌肽的设计理念,以LfcinB₁₈₋₂₈为母肽,在保留其高电荷、高疏水性优点的基础上,依据对称结构的设计理念,引入氨基酸精氨酸(R)和色氨酸(W)替换,设计出同样含11个氨基酸残基的新型牛乳铁蛋白衍生物肽KWRRWQWRWK-NH₂(KW-WK),以期提高LfcinB₁₈₋₂₈的抑菌性和稳定性、减少其毒性和溶血性,从而得到更有指导性的设计方法和更具有应用潜力的新型抗菌肽。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抗菌肽KW-WK和LfcinB₁₈₋₂₈均由上海吉尔(GL)生化有限公司合成,合成后经反向高效液相色谱仪纯化和电喷雾质谱仪鉴定,合成的肽用无菌蒸馏水溶解,使其浓度为2.56 mmol/L, -20℃保存备用。实验所用菌株大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、大肠杆菌(*E. coli* UB1005)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 25923)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis* ATCC 12228)、单核细胞性李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CMCC 54004)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*

C77-31)、鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium* ATCC14028)、鸡白痢沙门菌(*S. typhimurium* C79-13)、沙门菌(*S. enterica* subsp. *enterica* CMCC 50071),均为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存。实验所用人肾上皮293细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存。胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶K美国Sigma公司;噻唑蓝(thiazolylblue, MTT)、三氟乙醇(trifluoroethanol, TFE)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 美国Biosharp公司。

1.2 仪器与设备

VD-1320型超净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司;721型可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;ZHWY-211D摇床振荡培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司;XMTD-4000电热恒温水浴锅 北京市永元明医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 分子特性的预测

抗菌肽的理论分子质量和净电荷通过http://web.expasy.org/compute_pi/预测,疏水性和疏水力矩通过<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>预测。

1.3.2 二级结构的测定

抗菌肽KW-WK和LfcinB₁₈₋₂₈的二级结构采用圆二色谱法进行测定^[5]。将肽溶解在10 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)、50% TFE溶液、30 mmol/L SDS溶液中,使其终浓度为60 μmol/L,分别模拟水环境、生物膜的疏水环境、带负电荷的原核细胞膜环境,然后用圆二色谱仪对样品溶液进行测定。

1.3.3 菌种的培养

将冻存于-20℃的待测菌株活化两代后,划线接种于琼脂培养基中,37℃培养18~20 h,挑取单菌落,接种于20 mL无菌肉汤培养基中,过夜培养后,按2%接种量接于10 mL新鲜肉汤培养基中,培养2~4 h,至菌体处于对数生长期,调整菌体浓度为1×10⁵ CFU/mL,备用。

1.3.4 抑菌活性的测定

参考Libardo等^[6]的方法。在96孔板中,采用2倍系列梯度法用牛血清蛋白(albumin from bovine serum, BSA)溶液倍比稀释抗菌肽溶液,第1号孔中加10 μL待测肽溶液,90 μL BSA溶液,倍比稀释到第10号孔,并接入50 μL的菌液。第11号孔加菌液不加肽为阳性对照,第12号孔不加肽和菌液为阴性对照。37℃培养18~24 h,无肉眼可见菌体生长的最低浓度即为该肽的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

1.3.5 溶血活性的测定

参考Stark等^[7]的方法。取1 mL人的新鲜血液,1 000×g离心10 min后,收集红细胞,用PBS洗涤3次,

然后用10 mL PBS重悬细胞。在96孔板的前10个孔中,用PBS将肽分别稀释为1.3.4节所述的浓度,并加入50 μ L红细胞悬液。第11号孔加入50 μ L红细胞悬液和50 μ L 0.01% Triton X-100作为阳性对照,第12号孔加入50 μ L的红细胞悬液和50 μ L PBS作为阴性对照。37 $^{\circ}$ C培养1 h后取出,4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g离心10 min,再将上清液转移到干净的96孔板对应的孔中,用酶标仪于波长570 nm处测吸光度。按下式计算溶血率:

$$\text{溶血率}/\% = \frac{A - A_0}{A_i - A_0} \times 100$$

式中: A 为抗菌肽样品处理组的吸光度; A_i 为阳性对照组的吸光度; A_0 为阴性对照组的吸光度。

1.3.6 细胞毒性的测定

采用MTT法,MTT溶液和肾上皮293悬液的制备按照Schmidtchen等^[8]的方法。按照1.3.4节方法稀释肽。第11号孔加细胞不加肽为阳性对照,第12号孔不加细胞和肽为阴性对照。37 $^{\circ}$ C培养24 h,每孔加40 μ L MTT溶液,培养4 h,加150 μ L的二甲亚砷溶液,低速振荡10 min,用酶标仪测波长492 nm处的吸光度。

1.3.7 稳定性的测定

抗菌肽的稳定性测定主要包括热稳定性、盐稳定性、酶稳定性等。选取大肠杆菌ATCC 25922为实验菌株,未经高温、盐离子、蛋白酶等处理的抗菌肽为对照组。

1.3.7.1 热稳定性的测定

抗菌肽在100 $^{\circ}$ C加热1 h,然后测定MIC。

1.3.7.2 盐稳定性的测定

分别配制7种含不同盐离子(NaCl、KCl、NH₄Cl、MgCl₂、ZnCl₂、CaCl₂、FeCl₃)浓度的MHB培养基,待高温灭菌后用该含盐培养基调整菌体浓度为1 \times 10⁵ CFU/mL。然后,按照1.3.4节方法稀释抗菌肽,加入该含盐菌液,并使96孔板中7种盐离子的终浓度分别为NaCl 150 mmol/L、KCl 4.5 mmol/L、NH₄Cl 6 μ mol/L、MgCl₂ 1 mmol/L、ZnCl₂ 8 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、FeCl₃ 4 mmol/L,测定抗菌肽的MIC。

1.3.7.3 酶稳定性的测定

在37 $^{\circ}$ C水浴条件下,用反应终质量浓度为1 mg/mL的胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K溶液分别处理抗菌肽1 h,然后测定其MIC。

1.4 数据处理

每个待测样品均重复3次,用Excel软件对原始数据进行处理,之后采用SPSS 17.0软件进行显著性分析, $P < 0.05$,差异显著。

2 结果与分析

2.1 KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的分子特性

表1 KW-WK抗菌肽和LFcinB₁₈₋₂₈的分子特性

Table 1 Characterization of KW-WK peptide and LFcinB₁₈₋₂₈

抗菌肽	氨基酸序列	分子质量/Da		净电荷	疏水性	疏水力矩	纯度/%
		理论值	实际值				
KW-WK	KWRRWQWRRWK-NH ₂	1 772.1	1 771.13	+6	0.441	0.251	96.94
LFcinB ₁₈₋₂₈	KCRRWQWRMKK-NH ₂	1 605.9	1 605.2	+6	0.420	0.095	95.81

如表1所示,KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的实际分子质量(分别为1 171.13、1 605.2 Da)与理论分子质量(分别为1 172.1、1 605.9 Da)很接近,表明合成肽是所需要的目标肽。KW-WK较LFcinB₁₈₋₂₈的净电荷和疏水性相差不大,但疏水力矩有了较大的提高,表明KW-WK的两亲性有了较大的增强。

2.2 KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的二级结构测定结果

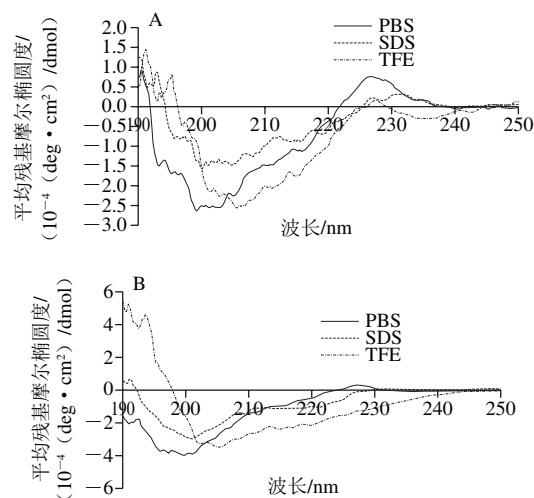


图1 KW-WK (A) 和LFcinB₁₈₋₂₈ (B) 在10 mmol/L的PBS、50% TFE和30 mmol/L SDS溶液中的圆二色谱图

Fig. 1 CD spectra of KW-WK (A) and LFcinB₁₈₋₂₈ in (B) 10 mmol/L in sodium phosphate buffer, 50% TFE, or 30 mmol/L SDS

由图1可知,在PBS(模拟水环境)中,2条肽在波长200 nm附近都呈现一个负的特征峰,这是蛋白质和多肽无规卷曲的典型特征^[9]。在SDS溶液中,KW-WK在波长195 nm附近呈现出正的特征峰,在波长208 nm和222 nm处呈现出2个负的特征峰,表明KW-WK在模拟细胞膜环境中,以 α -螺旋结构存在^[10-11]。LFcinB₁₈₋₂₈在波长200 nm处有一个明显的负峰,说明其在SDS溶液中为无规卷曲结构;在TFE溶液中,LFcinB₁₈₋₂₈在波长195~198 nm处出现了正的特征谱带,在波长217~218 nm处出现了一个负的特征肩峰谱带,这是 β -折叠构象的典型图谱特征^[3]。

2.3 抑菌活性测定结果

表 2 KW-WK抗菌肽和LFcinB₁₈₋₂₈的MIC
Table 2 MIC of KW-WK peptide and LFcinB₁₈₋₂₈

抗菌肽	MIC/ (μmol/L)	
	KW-WK	LFcinB ₁₈₋₂₈
革兰氏阴性菌		
大肠杆菌ATCC 25922	4	16
大肠杆菌UB1005	8	128
鼠伤寒沙门菌C 77-31	16	>128
鼠伤寒沙门菌ATCC 14028	32	>128
鸡白痢沙门菌C 79-13	16	>128
沙门菌CMCC 50071	128	>128
革兰氏阳性菌		
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	8	>128
金黄色葡萄球菌ATCC 25923	32	128
表皮葡萄球菌ATCC 12228	8	>128
MHC	>256	>256
GM	28.00	200.89
TI	9.14	1.28

注: MHC.最小溶血浓度 (minimal hemolytic concentration, MHC) 为引起人红细胞5%溶血率时肽的浓度; GM. geometric mean, 肽对所有菌种的最小杀菌浓度的几何平均数; TI.治疗指数 (therapeutic index, TI) 为肽的最小溶血浓度与最小杀菌浓度的几何平均数的比值。

由表2可知, KW-WK的MIC范围为4~128 μmol/L, GM为28.00 μmol/L。其对大肠杆菌ATCC 25922的抑菌性最强, MIC为4 μmol/L, 而对沙门菌CMCC 50071的抑菌性最弱, MIC为128 μmol/L。母肽LFcinB₁₈₋₂₈的抑菌效果较差, 除了对大肠杆菌ATCC 25922的抑菌效果强之外, 对其余8株致病菌的MIC均大于64 μmol/L, GM为200.89 μmol/L。

2.4 溶血活性测定结果

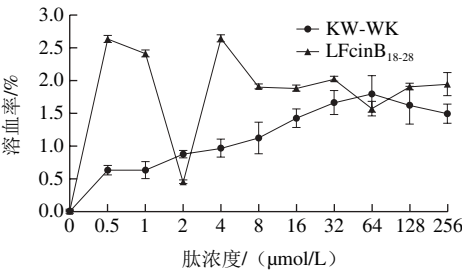


图 2 KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的溶血活性
Fig. 2 Hemolytic activities of KW-WK and LFcinB₁₈₋₂₈

由图2可知, 随着肽浓度的增加, KW-WK的溶血率呈先上升后下降的趋势, 说明受试肽对红细胞的溶血率呈浓度依赖性。当肽浓度在1~256 μmol/L时, 2条肽对红细胞的溶血率始终都在5%以下, 说明2条肽的溶血性都很弱。

2.5 细胞毒性测定结果

由图3可知, 当肽浓度在0.5~256 μmol/L之间时, KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈对细胞存活率影响无显著差异 ($P>0.05$)。当LFcinB₁₈₋₂₈的浓度在1~64 μmol/L之间

时, 细胞的存活率在95%以上, 当KW-WK的浓度在1~128 μmol/L之间时, 细胞的存活率依然在95%以上, 表明KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的细胞毒性都很小。

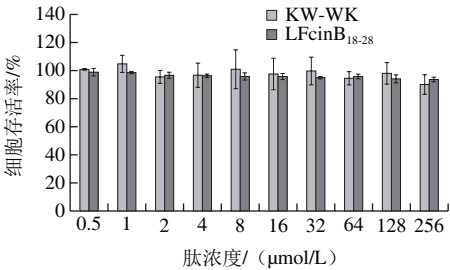


图 3 KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的细胞毒性
Fig. 3 Cytotoxicity of KW-WK and LFcinB₁₈₋₂₈

2.6 稳定性测定结果

2.6.1 热稳定性

表 3 热处理后KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的MIC
Table 3 MIC of KW-WK and LFcinB₁₈₋₂₈ after heat treatment

抗菌肽	MIC/ (μmol/L)	
	实验组	对照组
KW-WK	4	4
LFcinB ₁₈₋₂₈	16	16

由表3可知, KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈经100 °C处理1 h, MIC仍为4 μmol/L和16 μmol/L, 说明2条肽的稳定性不受高温影响。

2.6.2 盐稳定性

表 4 盐溶液处理后KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的MIC
Table 4 MIC of KW-WK and LFcinB₁₈₋₂₈ in the presence of salts

抗菌肽	MIC/ (μmol/L)							对照组
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺	NH ₄ ⁺	
KW-WK	8	4	8	8	8	4	8	4
LFcinB ₁₈₋₂₈	16	16	16	16	8	4	8	16

由表4可知, K⁺、Fe³⁺对KW-WK的抑菌活性没有影响, MIC仍为4 μmol/L; 其他5种阳离子处理后的MIC为8 μmol/L, 虽然比对照组的4 μmol/L略高, 但依然保持较高的抑菌活性。Zn²⁺、Fe³⁺、NH₄⁺能增强LFcinB₁₈₋₂₈的抑菌活性, MIC从16 μmol/L降低到8 μmol/L或4 μmol/L, 其他阳离子不影响LFcinB₁₈₋₂₈的抑菌活性, MIC不变。从结果可以看出, 2条肽均具有较好的阳离子稳定性。

2.6.3 酶稳定性

表 5 蛋白酶溶液处理后KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的MIC
Table 5 MIC of KW-WK and LFcinB₁₈₋₂₈ after treatment with proteases

抗菌肽	MIC/ (μmol/L)				对照组
	胃蛋白酶	胰蛋白酶	木瓜蛋白酶	蛋白酶K	
KW-WK	16	>128	8	8	4
LFcinB ₁₈₋₂₈	>128	>128	>128	>128	16

由表5可知, KW-WK经胰蛋白酶处理后, MIC由4 $\mu\text{mol/L}$ 增加为128 $\mu\text{mol/L}$ 以上, 完全失活。经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶K处理后MIC分别为16、8 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$, 虽然有所升高但依然有较好的抑菌活性。4种蛋白酶对LFcinB₁₈₋₂₈的抑菌活性影响很大, 处理后的LFcinB₁₈₋₂₈的MIC均大于128 $\mu\text{mol/L}$, 完全失活。

3 讨论

大量研究表明, 正电荷、疏水性和两亲性是决定抗菌肽生物活性的重要因素^[12-13], 母肽LFcinB₁₈₋₂₈具有较高的电荷数(+6)和较强的疏水性(0.420), 但两亲性相对较弱。精氨酸和色氨酸是高效抗菌肽的重要组成部分^[14-15], 精氨酸带有正电荷, 能够有效地与细菌中带负电荷的成分(脂多糖、磷脂等)相互作用, 从而能够较为牢靠的黏附在细菌细胞膜的表面^[16]; 色氨酸侧链同时具有极性和疏水性, 这使得色氨酸较易分布在亲疏水的界面处, 有助于将抗菌肽锚定在细胞膜的表面^[16]。一些研究表明, 对称结构能显著提高抗菌肽的生物活性^[17]。所以, 本研究在LFcinB₁₈₋₂₈高电荷、强疏水性的基础上, 依据对称结构的设计理念, 引入氨基酸(精氨酸、色氨酸)替换, 增强了两亲性, 成功设计出新型抗菌肽KW-WK。

大量研究表明, 高效抗菌肽的二级结构, 以 α -螺旋最多^[18-20]。本实验中2条肽在PBS中都为无规卷曲结构; 在SDS溶液中KW-WK呈 α -螺旋结构, LFcinB₁₈₋₂₈依然为无规卷曲结构; 在TFE溶液中LFcinB₁₈₋₂₈为 β -折叠构象。这说明设计改造的抗菌肽KW-WK, 在模拟细胞膜环境(SDS溶液)中会从无规卷曲转变成 α -螺旋结构。 α -螺旋中的亲水侧链和疏水侧链分别处于螺旋的两侧, 这一特殊结构会促进生物膜和多肽片段相互作用。当抗菌肽与细菌的细胞膜结合时, α -螺旋会相互聚集, 在细胞膜表面形成孔洞, 造成细胞内容物外流, 细胞死亡。所以, α -螺旋结构对抗菌肽的抑菌活性有积极的影响^[21]。抑菌活性的实验结果表明KW-WK的抑菌活性远大于LFcinB₁₈₋₂₈, 这也在一定程度上证明 α -螺旋结构能够增强抗菌肽的抑菌活性。LFcinB₁₈₋₂₈为 β -折叠抗菌肽, 可能是因为氨基酸序列中含有一个半胱氨酸, 半胱氨酸是形成 β -折叠的必须氨基酸^[22]。

TI越大, 表明抗菌剂的抗菌特异性越强, 细胞选择性越好^[23]。一般认为TI大于2.00为有效低毒, TI大于3.00有临床试用意义^[24], 常用抗生素S632A、诺西肽、利巴韦林的TI分别13.61、4.8、9.35^[25-27]。由抑菌活性、溶血活性和细胞毒性的结果可知, KW-WK的TI(9.14)远大于LFcinB₁₈₋₂₈的TI(1.28), 说明KW-WK的细胞选择性较强, 更适合作为抗生素替代品、食品防腐剂和饲料添加剂等。

抗菌肽应用于生产, 要受到多种不稳定因素的影响, 例如高温环境, 人和动物口腔、胃、肠道内的蛋白酶, 各种阳离子等方面^[28]。因此, 本实验从高温、盐离子、蛋白酶这3个方面研究KW-WK和LFcinB₁₈₋₂₈的稳定性。2条肽经加热后的抑菌活性依然很高, 这之前报道的大部分抗菌肽具有良好的热稳定性相一致^[11]。2条肽对不同盐离子的稳定性不同, 但整体的盐离子稳定性较好, Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等会降低KW-WK的抑菌性, 这可能是因为阳离子的结合位点是革兰阴性菌细胞膜上带负电荷的脂多糖, 而阳离子抗菌肽也是通过静电作用与细菌细胞膜结合, 两者是竞争关系^[29]。因此, 增强溶液中阳离子的浓度会抑制抗菌肽与细胞膜作用, 从而使抑菌性降低。KW-WK经胰蛋白酶处理后的抑菌活性大大降低, 受胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K的影响较小, 这可能是由不同蛋白酶的酶切位点不同造成的。研究表明, 胃蛋白酶的酶切位点是疏水性氨基酸或芳香族氨基酸^[30]。木瓜蛋白酶属于巯基蛋白酶, 作用位点是精氨酸、赖氨酸和甘氨酸结合的肽键^[30]。蛋白酶K的酶切位点具有广泛特异性, 倾向裂解脂肪族氨基酸残基^[31]。蛋白酶的酶切位点是赖氨酸和精氨酸羧基端形成的肽键^[32-33]。KW-WK含有赖氨酸和精氨酸, 因此会被胰蛋白酶切断失活。LFcinB₁₈₋₂₈经4种蛋白酶处理后抑菌活性均丧失, 说明LFcinB₁₈₋₂₈具有4种蛋白酶的酶切位点。

4 结论

本研究在LFcinB₁₈₋₂₈的高电荷、强疏水性的基础上, 依据对称结构的设计理念成功设计出新型抗菌肽KW-WK, 结果表明, 新型抗菌肽KW-WK比母肽具有更高的细胞选择性, 抑菌性好, 溶血性和细胞毒性低, 热稳定性好, 抗蛋白酶酶解的能力强。证明通过氨基酸替换、增强两亲性和对称结构等设计理念能明显改善抗菌肽LFcinB₁₈₋₂₈的生物活性, 新型抗菌肽KW-WK具有作为抗生素替代品、食品防腐剂、饲料添加剂的巨大潜力。

参考文献:

- [1] LEE W, DONG G L. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2015, 1848(2): 673-679. DOI:10.1016/j.bbame.2014.11.024.
- [2] ONG Z Y, CHENG J, HUANG Y, et al. Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(4): 1315-1325. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.10.053.
- [3] CHOU S, SHAO C, WANG J, et al. Short, multiple-stranded β -hairpin peptides have antimicrobial potency with high selectivity and salt resistance[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 30: 78-93. DOI:10.1016/j.actbio.2015.11.002.

- [4] BOWDISH D M, DAVIDSON D J, SCOTT M G, et al. Immunomodulatory activities of small host defense peptides[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(5): 1727-1732. DOI:10.1128/AAC.49.5.1727-1732.2005.
- [5] DONG N, MA Q, SHAN A, et al. Design and biological activity of beta-hairpin-like antimicrobial peptide[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(2): 243-250.
- [6] LIBARDO M D, NAGELLA S, LUGO A, et al. Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 456(1): 446-451. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.104.
- [7] STARK M, LIU L P, DEBER C M. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(11): 3585-3590. DOI:10.1128/aac.46.11.3585-3590.2002.
- [8] SCHMIDTCHEN A, RINGSTAD L, KASETTY G, et al. Membrane selectivity by W-tagging of antimicrobial peptides[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2011, 1808(4): 1081-1091. DOI:10.1016/j.bbamem.2010.12.020.
- [9] PANDEY B K, AHMAD A, ASTHANA N, et al. Cell-selective lysis by novel analogues of melittin against human red blood cells and *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(36): 7920-7929. DOI:10.1021/bi100729m.
- [10] UNGER T, OREN Z, SHAI Y. The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(21): 6388-6397. DOI:10.1021/bi0026066.
- [11] MA Q Q, DONG N, SHAN A S, et al. Biochemical property and membrane-peptide interactions of *de novo* antimicrobial peptides designed by helix-forming units[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(6): 2527-2536. DOI:10.1007/s00726-012-1334-7.
- [12] YOUNT N Y, BAYER A S, XIONG Y Q, et al. Advances in antimicrobial peptide immunobiology[J]. *Peptide Science*, 2010, 84(5): 435-458. DOI:10.1002/bip.20543.
- [13] HANCOCK R E W, CHAPPLE D S. Minireview: peptide antibiotics[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(6): 1317-1323. DOI:10.1016/S0140-6736(97)80051-7.
- [14] SCHIBLI D J, NGUYEN L T, KERNAGHAN S D, et al. Structure-function analysis of tritrypticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(12): 4413-4426. DOI:10.1529/biophysj.106.085837.
- [15] ANDRUSHCHENKO V, AARABI M, LT, PRENNER E, et al. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008, 1778(4): 1004-1014. DOI:10.1016/j.bbamem.2007.12.022.
- [16] CHAN D I, PRENNER E J, VOGEL H J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2006, 1758(9): 1184-1202. DOI:10.1016/j.bbamem.2006.04.006.
- [17] LI W, TAN T, XU W, et al. Rational design of mirror-like peptides with alanine regulation[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(2): 403-417. DOI:10.1007/s00726-015-2094-y.
- [18] 枚春成. 二级结构对抗菌肽的抗菌活性及特异性的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2013: 17-33.
- [19] WANG Z, WANG G. APD: the antimicrobial peptide database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: D590. DOI:10.1093/nar/gkh025.
- [20] WANG G, LI X, WANG Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: D933. DOI:10.1093/nar/gkn823.
- [21] SRISAILAM S, ARUNKUMAR A I, WANG W, et al. Conformational study of a custom antibacterial peptide cecropin B1: implications of the lytic activity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1479(1): 275-285. DOI:10.1016/s0167-4838(00)00008-x.
- [22] REDDY K, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536-547. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005.
- [23] 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]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(13): 12316-12329. DOI:10.1074/jbc.m413406200.
- [24] 刘枣, 干信. 魔芋葡甘低聚糖硫酸酯抗柯萨奇病毒B3药理作用[J]. *湖北工业大学学报*, 2007, 22(5): 57-62. DOI:10.3969/j.issn.1003-4684.2007.05.017.
- [25] 何健民, 石立莹, 李晓眠, 等. 两种检测抗生素S632A对Vero细胞毒性作用方法的比较[J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(1): 33-35. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2006.01.009.
- [26] 吴婷, 黄海. 诺西肽抗乙肝病毒体外实验研究[J]. *中国抗生素杂志*, 1997, 22(5): 373-376. DOI:10.13461/j.cnki.cja.002152.
- [27] 徐培平, 赵昉, 刘妮, 等. 中药体外防治甲型H1N1流感病毒实验研究[J]. *实用预防医学*, 2012, 19(8): 1121-1124. DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2012.08.001.
- [28] TANG W, YUAN H, ZHANG H, et al. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method[J]. *Food Control*, 2015, 50(3): 413-422. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.09.030.
- [29] ZHU X, ZHANG L C, WANG J, et al. Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity[J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 18(4): 155-167. DOI:10.1016/j.actbio.2015.02.023.
- [30] 董娜. β -折叠抗菌肽的分子设计、生物学活性及抑菌机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 39-77.
- [31] 郝刚. BuforinII抗菌肽的分子设计及对DNA作用抑菌机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 43-47.
- [32] PUENTE X S, S NCHEZ L M, OVERALL C M, et al. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(7): 544-558. DOI:10.1038/nrg1111.
- [33] GUPTA R, BEG Q K, LORENZ P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2002, 59(1): 15-32. DOI:10.1007/s00253-002-0975-y.