

防御素 rPaDef 的定向分子改良及其抗菌机制

凤英,李文娟,刘庆艳,代红霞,樊振川*
(天津科技大学 食品科学与工程学院,天津 300457)

摘要: 美洲鳄梨变种防御素(*Persea americana* var. *dryifolia* defensin, PaDef)是从墨西哥鳄梨果实中提取的一种具有广谱抗菌作用的防御素,其结构-活性构效关系及其抗菌机制尚未明确。该文利用定点突变的方法对重组 PaDef (recombination PaDef, rPaDef)进行定向分子改良。最终获得改良肽 rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M,其抗菌活性上调 2~3 倍,同时保持良好的稳定性和较低的溶血性和细胞毒性。用扫描电子显微镜和荧光显微探究 rPaDef 及改良肽的抗菌机制,表明 rPaDef 及改良肽能够在细菌表面产生孔隙,破坏受试菌的细胞完整性,最终导致细菌死亡。因此 rPaDef 及改良肽可以作为新型抗生素替代物,在食品贮藏保鲜、绿色饲料添加剂以及临床医药领域等方面有较大应用前景。

关键词: 抗菌肽;美洲鳄梨变种防御素;定向改良;抗菌活性;抗菌机制

Targeted Molecular Modification and Antibacterial Mechanism of Defensin rPaDef

FENG Ying, LI Wenjuan, LIU Qingyan, DAI Hongxia, FAN Zhenchuan*

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Persea americana* var. *dryifolia* defensin (PaDef) has a broad-spectrum antibacterial action, and it was extracted from the fruit of Mexican avocado. The structure-activity relationship and antibacterial mechanism of PaDef have not yet been clarified. Therefore, targeted molecular modification of recombination PaDef (rPaDef) was carried out by site directed mutagenesis. Finally, modified peptides rPaDefQ33H and rPaDefK43M with 2-3 fold increased antibacterial activity were obtained while maintaining good stability and low hemolysis and cytotoxicity. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy were used to investigate the antibacterial mechanism of rPaDef and modified peptides, indicating that rPaDef and modified peptides could create pores on the surface of bacteria, disrupt the cell integrity of the tested bacteria, and ultimately lead to bacterial death. Therefore, rPaDef and modified peptides could be used as substitutes for new antibiotics and had great application prospects in food storage and preservation, green feed additives, and clinical medicine fields.

Key words: antibacterial peptide; PaDef; targeted modification; antibacterial activity; antibacterial mechanism

引文格式:

凤英,李文娟,刘庆艳,等. 防御素 rPaDef 的定向分子改良及其抗菌机制[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(3): 188-196.

FENG Ying, LI Wenjuan, LIU Qingyan, et al. Targeted Molecular Modification and Antibacterial Mechanism of Defensin rPaDef[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 188-196.

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是具有天然防御细菌能力和抵抗耐药细菌的一类小分子肽,是自然

免疫系统的重要组成部分,在植物、动物、昆虫和微生物中广泛存在^[1]。在植物 AMPs 中,防御素因其广谱

作者简介:凤英(1978—),女(蒙古),副研究员,博士研究生,研究方向:兽医微生物学研究及兽药研发。

*通信作者:樊振川(1974—),男(汉),教授,研究方向:营养代谢性疾病研究。

抗菌特性而备受关注^[2]。与一级结构相比,防御素的三维结构高度稳定,由1个二硫化物稳定的 $\alpha\beta$ (C $\alpha\beta$)基序^[3]、1个突出的 α -螺旋^[4]和1个三重反平行 β -折叠组成^[5]。根据报告,防御素序列中还有一个重要的核心碱基序列(GXCX3-9c),对抗菌活性有重要贡献。研究指出,防御素通常被认为对哺乳动物和植物细胞无毒^[6]。AMPs对细菌有不同的作用方式,一些抗菌肽通过渗透细胞膜杀死这些细菌^[7-8],而其他抗菌肽则与细菌细胞内的大分子作用^[9-10]。因此,植物防御素具有抗生素替代品的开发利用价值^[11]。

天然抗菌肽序列丰富,功能多样,但由于结构差异,抗菌肽的抗菌活性和分子功能存在较大差异。一般通过改变抗菌肽的电荷、两亲性、螺旋性和特殊氨基酸的数量,以及基因工程和定点突变对其定向改良^[12]。Fimland等^[13]发现色氨酸残基在膜相互作用肽中发挥了特殊作用。Kazaziem等^[14]提出N端抗菌肽的带电残基可能通过细菌素与靶细胞结合而影响细胞特异性^[14]。Ju等^[15]诱导氨基酸残基突变和新型细菌素Durancin GL的逆行位点诱导突变,发现3个突变体失去了抗菌活性,10个突变体的活性降低,7个突变体的活性更高。抗菌肽的活性可以通过在一定范围内增加正电荷数^[16]、C末端疏水性和特殊氨基酸的变化来增加^[17-19]。Ahn等^[20]用碱性氨基酸赖氨酸取代了亲水部位的天冬氨酸和组氨酸,在增加正电荷的同时保留疏水螺旋结构。

2013年,首次从墨西哥鳄梨果实中分离到了鳄梨防御素(PaDef)^[21]。PaDef由45个氨基酸组成,生物信息学分析表明,重组PaDef(recombination PaDef, rPaDef)作为一种防御素,其氨基酸序列与其他植物防御素具有80%的同源性,由1个稳定的C $\alpha\beta$ 基序(半胱氨酸稳定的 $\alpha\beta$ 基序)、1个 α -螺旋和3个反向 β -折叠以及它们之间的环形域组成。rPaDef此前已成功在毕赤酵母GS115中表达,其对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均表现出良好的抗菌活性^[22],rPaDef的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)为50~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,具有良好的热稳定性、pH稳定性和蛋白酶稳定性。不仅如此,rPaDef具有较低的人血、鸡血和鼠血溶血性和较低动物细胞毒性,即安全性良好,这些结果均可证明rPaDef抗菌肽具有巨大的应用前景^[22]。本研究旨在通过定向分子改良获得抗菌活性更高、稳定性更强以及具有较高生物安全性的改良肽。

1 材料与方

1.1 材料

pPICZ α A-rPaDef、pPICZ α A-rPaDefT3R、pPICZ α A-rPaDefD29R、pPICZ α A-rPaDefQ33H、pPICZ α A-rPaDefK43M等质粒;天津科技大学营养代谢性疾病研究

实验室制备保存;Pichia pastoris菌株GS115:Invitrogen公司;Listeria monocytogenes(ATCC 21633)、Staphylococcus aureus(ATCC 25923)、Escherichia coli O157(ATCC 35150)和Salmonella enterica(ATCC 10467):美国菌种保藏中心(<http://www.atcc.org/>);人红细胞、鸡红细胞、小鼠红细胞:苏州汇智和源生物技术有限公司;Ni Sepharose™ 6 fast flow树脂:GE Healthcare公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS):美国Gibco公司;戊二醛(分析纯):福州飞净生物科技有限公司;碘化丙啶:美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

Bio-Rad小型垂直电泳转印系统:伯乐Bio-Rad公司;neon nxt细胞电转染系统、SpectraMax iD3/iD5多功能酶标仪、GENESYS 180紫外分光光度计:赛默飞世尔科技公司;Tm4000扫描电子显微镜:日本日立公司;BX-53荧光显微镜:日本Olympus公司;DNP-9022恒温培养箱:上海精其仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 rPaDef改良肽的载体构建和抗菌肽筛选

通过比较rPaDef序列与其他防御素序列确定保守区域,通过Discovery Studio 4.5预测抗菌肽结构^[23],通过定向改变净电荷、亲疏水性等性质,设计了4个改良肽(rPaDefT3R、rPaDefD29R、PaDefQ33H和rPaDefK43M)。利用定点突变构建并鉴定正确序列的质粒。经限制性内切酶(ByFastSacI Endonuclease, Sac I)线性化,利用电穿孔法将其转入宿主菌Pichia pastoris GS115。通过菌落聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)选择阳性克隆体,经甲醇诱导表达后,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)验证重组抗菌肽的表达^[22]。

1.3.2 重组抗菌肽的亲纯化

诱导表达的上清液与结合缓冲液按照1:3的体积比混合,并在4℃条件下结合,分别使用含20、40、60 mmol/L咪唑的溶液梯度漂洗,用含500 mmol/L咪唑的洗脱液洗脱,利用超滤管去除洗脱液中的咪唑后冷冻干燥,保存于-80℃以备后续使用。

1.3.3 抗菌活性测定

根据临床和实验室标准测定其抗菌活性^[22]。抑菌能力通过测量最小抑菌浓度和抑菌圈直径来表示。将培养至对数期($\text{OD}_{600}=1.0$)的受试菌稀释1000倍,将冻干的抗菌肽用置换缓冲液稀释至不同浓度,在96孔板中添加20 μL 的抗菌肽样品和100 μL 的受试菌稀释液,封口膜密封后在37℃培养16~24 h,酶标仪线性振荡30 s测定595 nm处的吸光度。细菌抑制率($I, \%$)计算公式如下,每组反应设置3个平行。

$$I = (A_1 - A_3) / (A_1 - A_2) \times 100$$

式中: A_1 为同时加入 PBS 和受试菌稀释液的吸光度; A_2 为同时加入庆大霉素和受试菌稀释液的吸光度; A_3 为同时加入 rPaDef 改良肽和受试菌稀释液的吸光度。

将培养至对数期($OD_{600}=1.0$)的受试菌稀释 100 倍,取 500 μL 均匀涂布于 LB 平板上,用直径 6 mm 的金属打孔器在平皿适当的位置打孔,用移液枪吸取 50 μL 的抗菌肽注入孔内。抑菌试验时,用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的庆大霉素作为阳性对照。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,正置培养 6~8 h,观察抑菌圈的大小,拍照并测量抑菌圈直径。

1.3.4 抗菌肽的稳定性和安全性测定

在不同温度(4、25、37、65、90 $^{\circ}\text{C}$)和不同种类蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K)的条件下检测 $1\times\text{MIC}$ 浓度的重组抗菌肽抑菌效果,结果用抑菌圈直径表示。用纯化后的抗菌肽处理人红细胞、鸡红细胞和小鼠红细胞(37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h)。PBS 和 0.2% 的 Triton X-100 分别用作阴性和阳性对照。在 576 nm 处测量释放的血红蛋白的吸收。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5)-dimethylthiaziazol(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT]法测定肽及其突变体对 HEK293 和 BHK21 细胞系的毒性。所有试验均设置 3 个平行。

1.3.5 抗菌肽的抗菌机制研究

受试菌株在 LB 培养基中生长至对数期,用 PBS 漂洗菌体。将菌株与 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMPs 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下共同孵育 1 h, PBS 作为阴性对照。孵育后的样品在 100 μL 的戊二醛中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,利用不同浓度的乙醇溶液(25%、50%、70%、80%、90% 和无水乙醇)进行脱水,每次 10 min,最终溶解在 10 μL 无水乙醇中,置于盖玻片上进行干燥后表面喷金,并通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)进行观察。

荧光显微镜样品,取对数期的受试菌与重组抗菌肽孵育后,与碘化丙啶(propidium iodide, PI)(1 mg/mL,使用时稀释 1 000 倍)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min,利用 PBS 洗去残余的 PI 染料后制片,在荧光显微镜下观察。

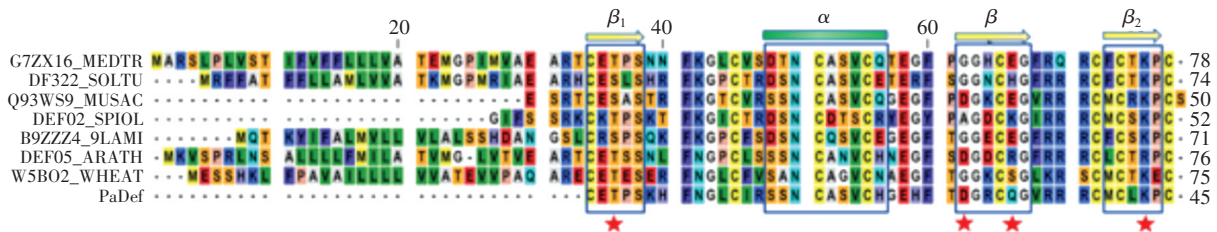
1.4 统计分析

所有数据均以平均值 \pm 标准差表示。使用 IBM SPSS 21.0 中的单向方差分析和邓肯多范围检验进行统计分析。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 改良抗菌肽的设计

为寻找 PaDef 的改良位点,首先对与美洲鳄梨密切相关物种的植物防御素抗菌肽进行蛋白序列对比,结果见图 1。



C 为半胱氨酸(cysteine);G 为甘氨酸(glycine);S 为丝氨酸(serine);P 为苯丙氨酸(phenylalanine);A 为天冬酰胺(asparagine); α 为 α 螺旋部位; β_1 、 β_2 为 β 折叠部位;★表示相似度较差。

图 1 PaDef 与其他植物防御素的序列比对

Fig.1 Sequence alignment of PaDef and other plant defensins

通过 rPaDef 与来自密切相关物种的其他植物防御素的多序列比对结果可知,PaDef 的部分序列与其他防御素的序列高度保守,包括典型的 7 个保守半胱氨酸残基、3 个甘氨酸残基、1 个丝氨酸残基、1 个苯丙氨酸残基和 1 个天冬酰胺残基,从结构上看,这些保守的氨基酸都存在 1 个 α 螺旋和 3 个反向 β 折叠部位,可能与防御素的抗菌活性有关,因此将这些位置的氨基酸进行突变以期能够得到抗菌活性增加的改良肽。

2.2 rPaDefT3R 与 rPaDefD29R 的结构预测结果

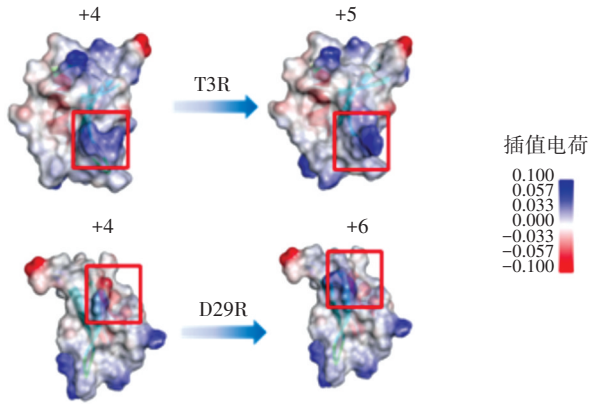
由于通过静电荷的改变可增强防御素的活性,分别在 rPaDef 的 3 号苏氨酸位及 29 号天冬氨酸位,对

rPaDef 进行点突变获得两种突变蛋白即 rPaDefT3R 与 rPaDefD29R,使用 Discover Studio 4.5 对两种蛋白结构进行预测,结果如图 2 所示。

图 2 结果显示,将第 3 位的苏氨酸(threonine, T)点突变为精氨酸(arginine, R)获得改良肽(reform PaDef T replace R in 3 site, rPaDefT3R),rPaDefT3R 增加了 1 个 PaDef 净电荷(+4~+5)。此外,将 29 位的天冬氨酸(aspartic acid, D)突变为精氨酸,获得改良肽(reform PaDef D replace R in 3 site, rPaDefD29R)增加了 2 个 PaDef 净电荷(+4~+6)。

2.3 rPaDefK43M 的结构预测结果

疏水基的改变同样可增强防御素的活性,而且在

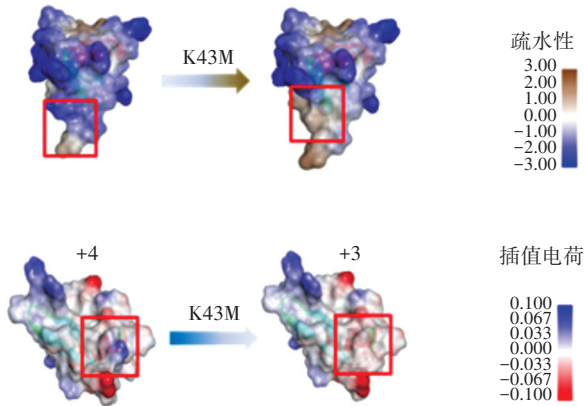


方框表示在三维结构中3号苏氨酸所在的位置。

图2 蛋白质表面根据电荷势着色

Fig.2 Protein surface coloring based on charge potential

PaDef的C端除了43位的赖氨酸其余7个氨基酸均是疏水性基团,据此本研究对PaDef的43位赖氨酸点突变为蛋氨酸获得 rPaDefK43M,使用 Discover Studio 4.5 对 rPaDefK43M 蛋白结构进行预测,结果如图3所示。



方框表示在三维结构中43位赖氨酸所在的位置。

图3 蛋白质表面分别根据亲疏水性和电荷势着色

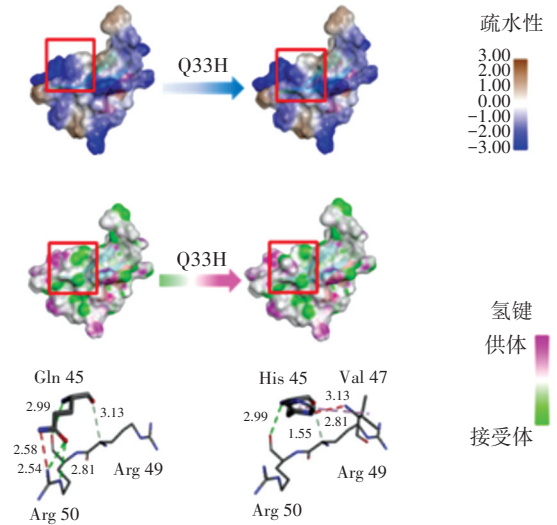
Fig.3 Protein surface coloring based on hydrophobicity and charge potential

图3结果显示,将43位赖氨酸突变为蛋氨酸(methionine, Met)获得改良肽(reform PaDef K replace R in 43 site, rPaDefK43M),同时降低了净电荷(+4~+3),增加了C末端的疏水性。

2.4 rPaDefQ33H 的结构预测结果

亲水基的改变可增强防御素的活性,将33位的谷氨酰胺突变为组氨酸获得改良肽 rPaDefQ33H 以增强表面亲水性而不改变净电荷,使用 Discover Studio 4.5 对 rPaDefQ33H 蛋白结构进行预测,结果如图4所示。

图4结果显示,将33位的谷氨酰胺(glutamine, Q)突变为组氨酸(histidine, H)获得改良肽(reform PaDef



方框表示在三维结构中33位的谷氨酰胺所在的位置。

图4 蛋白质表面根据亲疏水性和氢键着色

Fig.4 Protein surface coloring based on hydrophilicity and H-bond

Q replace H in 43 site, rPaDef(Q33H)通过 Discover Studio 4.5 预测结果显示,这种组氨酸可以与 PaDef 结构中的49位精氨酸(arginine 49, Arg49)、50位精氨酸(arginine 49, Arg49)和47位缬氨酸(valine 47, Val47)形成离子键。

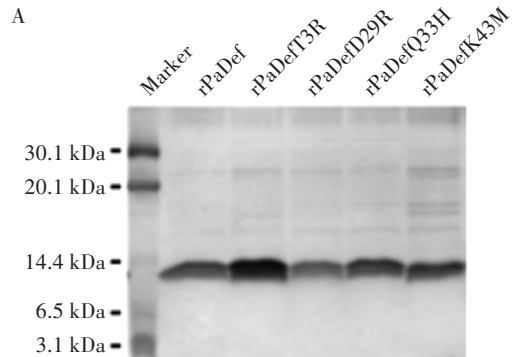
2.5 rPaDef 及其突变质粒真核表达鉴定结果

将重组 PaDef(rPaDef)及其突变质粒及其突变质粒转入毕赤酵母 GS115 进行真核表达,根据选择的突变位点,设计引物进行 PCR 扩增,经 SDS-PAGE-Tricine 电泳验证目的条带大小正确性,条带灰度值使用 Image J 进行分析,鉴定及分析结果如图5所示。

图5显示,rPaDef 及其改良肽均能正常表达,对条带的灰度分析表明,突变体 rPaDefT3R 和 rPaDefK43M 的蛋白表达水平高于 rPaDef。

2.6 rPaDef 及其改良肽对不同细菌菌株的 MIC 检测结果

对 rPaDef 及其改良肽的抑菌效果进行检测,各改良肽对受试菌株的 MIC 检测结果如表1与图6所示。



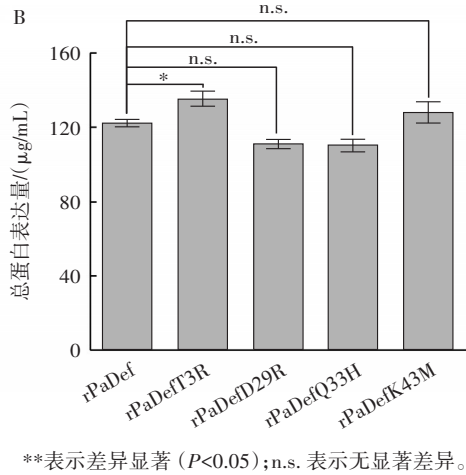
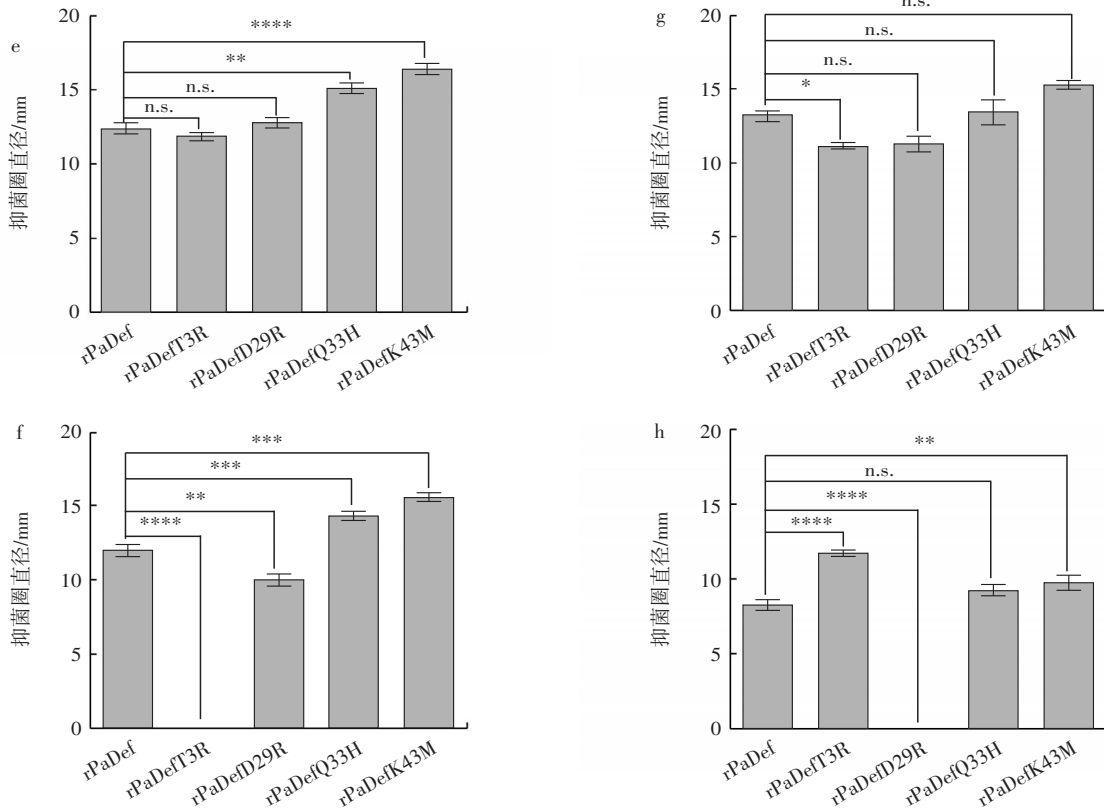
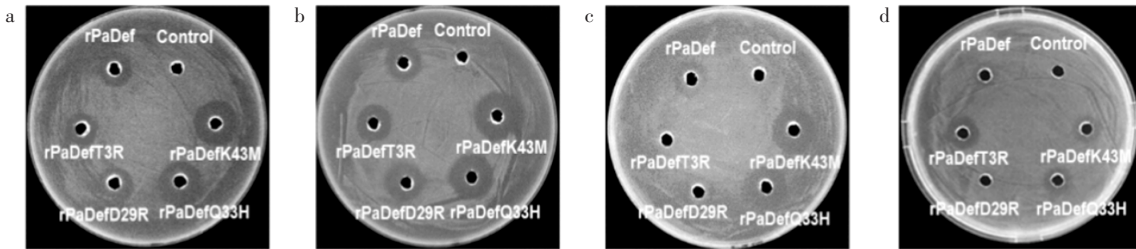


图5 几种改良肽的表达量分析

Fig.5 Analysis of expression levels of several modified peptides

表1 rPaDef及其改良肽的MIC测定
Table 1 MIC determination of rPaDef and modified peptides

受试菌株	MIC / (μg/mL)				
	rPaDef	rPaDefT3R	rPaDefD29R	rPaDefQ33H	rPaDefK43M
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC 221633)	60	40	40	20	20
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	70	60	60	20	20
<i>E. coli</i> O157 (ATCC 35150)	60	40	60	20	20
<i>S. enterica</i> (ATCC 10467)	40	40	60	40	20



a,e为 *S. aureus*(ATCC 25923); b,f为 *L. monocytogenes*(ATCC 221633); c,g为 *S. enterica*(ATCC 10467); d,h为 *E. coli* O157(ATCC 35150)。*表示差异显著 ($P<0.05$); **表示极显著 ($P<0.01$); ***表示差异非常显著 ($P<0.001$); ****表示差异高度显著 ($P<0.0001$); n.s. 表示无显著差异。

图6 rPaDef及其改良肽对于几种受试菌的抑制能力

Fig.6 Inhibition ability of rPaDef and modified peptides against several tested bacteria

表1显示,rPaDef对单增李斯特杆菌(*L. monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. Coli*)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S. enterica*)有不同程度的抑制作用。并且定向改良后的PaDef的抑菌能力会不同程度的提高,MIC为20~60 μg/mL,其中rPaDefQ33H和rPaDefK43M显示出高于rPaDef 1~2倍的抗菌活性。

图6结果显示,改良肽对于不同种类的受试细菌抑菌能力进行检测时,改良肽rPaDefQ33H和rPaDefK43M处理后的抑菌圈直径也明显大于PaDef、rPaDefT3R和rPaDefD29R,这也表明改良肽rPaDefQ33H和rPaDefK43M的抗菌效果要优于其它改良肽,因此后续试验主要围绕这两种改良肽进行研究。

2.7 PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M的杀菌动力学检测结果

PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M的杀菌动力学检测结果如图7所示。

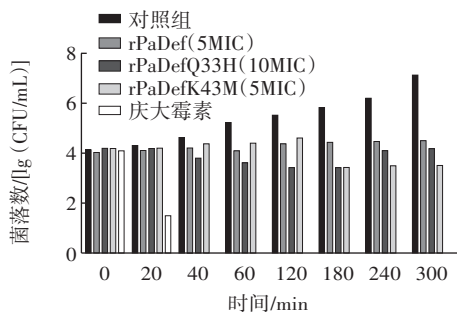


图7 rPaDef及其改良肽杀菌能力
Fig.7 Bactericidal ability of rPaDef and modified peptides

图7显示,与PBS阴性对照组相比,重组抗菌肽PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M在作用180 min后能将菌落数从4.3 lg(CFU/mL)降至3.1 lg(CFU/mL),而庆大霉素处理后40 min后菌落数从4.3 lg(CFU/mL)降至0 lg(CFU/mL)。因此,PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M是一种抑菌型而不是杀菌型防御素。

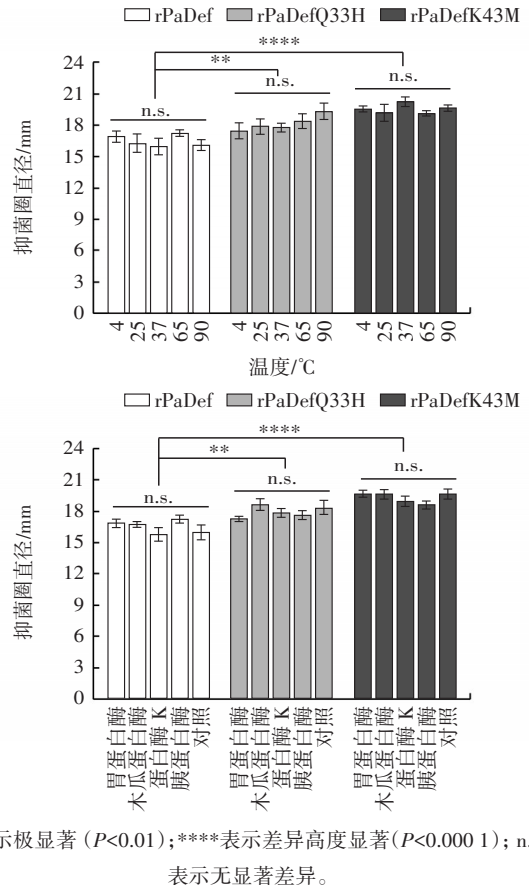
2.8 PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M改良肽的良好稳定性评价结果

根据PaDef及其改良肽的抗菌效果,选择rPaDefQ33H和rPaDefK43M两种改良肽,利用*Staphylococcus aureus*(ATCC 25923)作为受试菌比较PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M的稳定性,三者评价结果如图8所示。

图8显示,PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M抗菌肽在4~90℃温度范围以及不同种类蛋白酶处理下保留了接近100%的抑菌活性。

2.9 rPaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M改良肽良好的安全性评价结果

rPaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M改良肽的良

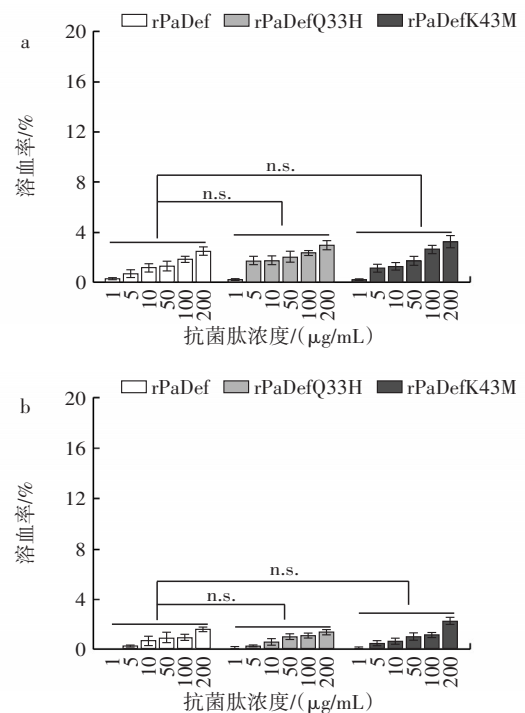


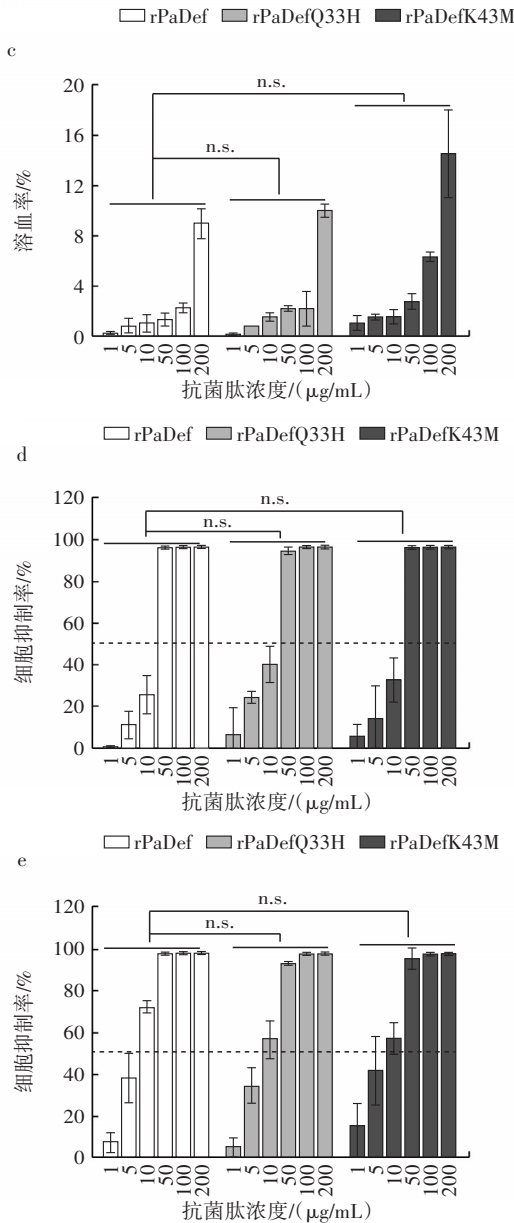
表示极显著 ($P < 0.01$); **表示差异高度显著 ($P < 0.0001$); n.s.表示无显著差异。

图8 rPaDef及其改良肽的稳定性
Fig.8 Stability of rPaDef and modified peptides

好的安全性评价结果如图9所示。

图9显示,改良肽对鸡和小鼠红细胞显示出较低的溶血活性。当改良肽的浓度达到200 μg/mL时,对





a. 鸡红细胞; b. 小鼠红细胞; c. 人红细胞; d. HEK293; e. BHK21。
n.s. 表示无显著差异。

图9 rPaDef及其改良肽的溶血性和细胞毒性

Fig.9 Hemolysis and cytotoxicity of rPaDef and modified peptides

人红细胞显示出一定的溶血活性。利用 BHK21 和 HEK293 进行了细胞毒性测定。改良肽对 HEK293 的细胞毒性低于对 BHK21 的细胞毒性,当用 10 μg/mL 的 rPaDefK43M 处理时, HEK293 细胞活力略高于 rPaDef、rPaDefQ33H 处理后的细胞活力。当改良肽浓度大于 50 μg/mL 时,两种细胞的存活率均较低。

2.10 rPaDef、rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 在细菌细胞膜表面形成孔隙电镜检测结果

rPaDef、rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 在细菌细胞膜表面形成孔隙电镜检测结果如图 10 所示。

扫描电子显微镜和荧光显微镜观察 rPaDef、

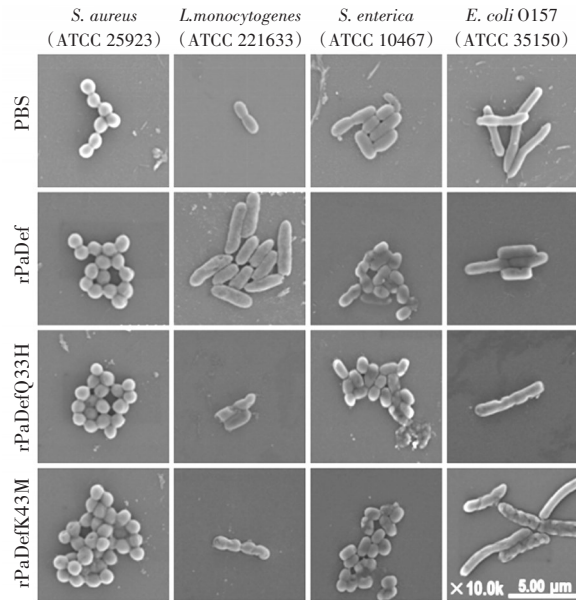


图10 SEM观察rPaDef及其改良肽对受试菌的作用

Fig.10 Scanning electron microscopy observation of effects of rPaDef and modified peptides on tested bacteria

rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 在细菌细胞膜表面形成孔隙,图 10 显示,与 PBS 处理的对照组相比,无论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌,经 PaDef、rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 处理后的受试菌株表面都被破坏,产生孔隙,这些孔隙会使细菌细胞的内容物流出,最终导致细菌死亡。

2.11 rPaDef、rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 在细菌细胞膜表面形成孔隙荧光检测结果

rPaDef、rPaDefQ33H 和 rPaDefK43M 在细菌细胞膜表面形成孔隙荧光检测结果如图 11 所示。

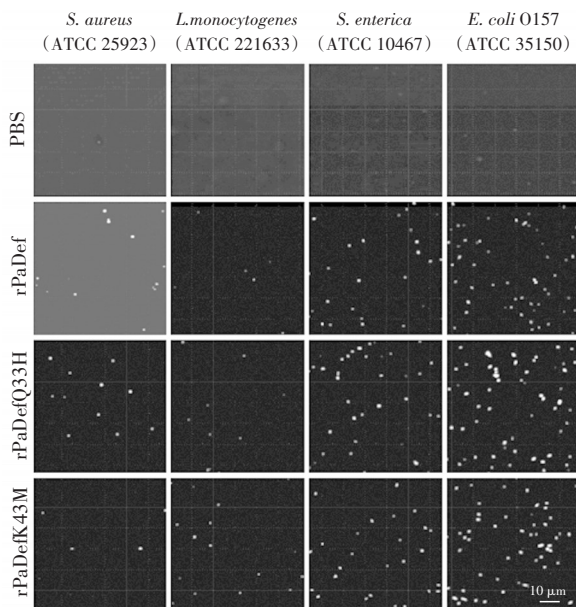


图11 荧光显微镜观察rPaDef及其改良肽对受试菌的作用

Fig.11 Fluorescence microscope observation of effects of rPaDef and modified peptides on tested bacteria

碘化丙啶(PI)只能穿透受损的细胞膜与DNA结合并将DNA染成红色。为了进一步研究其抗菌机理,将PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M处理过的受试菌中利用PI染色,清除多余的PI染料后利用荧光显微镜检测了与DNA结合的PI,如图11所示,PaDef、rPaDefQ33H和rPaDefK43M的处理破坏了受试细菌细胞膜的完整性,因此PI能够穿透受损的细胞膜并将DNA染成红色。由于革兰氏阴性细菌的质膜穿透率高于革兰氏阳性细菌,因此抗菌肽处理后的革兰氏阴性菌的荧光强度要高于革兰氏阳性菌。

3 结论

毕赤酵母表达的重组抗菌肽rPaDef具有广泛的抗菌谱和抑菌能力,但其抗菌活性不是很强。本研究以重组抗菌肽rPaDef为模板,分别从改变其净电荷数量、亲疏水性以及改变其环结构域的结构等方面出发,利用定点突变和基因工程等方法设计并体外表达rPaDef及其改良肽。经过对其抗菌能力及稳定性、安全性等方面的研究,结果显示改良肽rPaDefQ33H和rPaDefK43M抗菌活性上调了1~2倍,且其稳定性和安全性并不受到影响。由此分析,净电荷数量和环结构域的改变对于rPaDef的抗菌能力的影响较小,如改良肽rPaDefT3R和rPaDefD29R的抑菌能力并未发现显著提高。而改良肽rPaDefQ33H和rPaDefK43M表面的疏水提高的情况下,改良肽的抗菌活性显著提高,尤其是rPaDefK43M在净电荷数量减少的情况下抗菌活性仍然显著提高。该试验结果明抗菌肽rPaDef表面的亲疏水性是影响其抗菌能力的主要因素。对其抑菌机制的初步探索表明,抗菌肽rPaDef及其改良肽破坏了受试细菌的完整性,导致细菌细胞内容物流出,最终导致细菌死亡。在荧光显微镜下观察到抗菌肽rPaDef及改良肽处理后的细菌能够被PI染色。并且通过对其荧光强度的分析,似乎rPaDef及其改良肽对于革兰氏阴性菌的质膜穿透率更高,一方面可能是由于革兰氏阴性菌具有较薄的肽聚糖层,容易在抗菌肽的作用下穿透脂膜。此外,rPaDef的另一个抗菌机制可能是与革兰氏阴性菌表面的脂质膜成分结合而发生相互作用,这也能解释rPaDef表面疏水性的提高能够显著提升其抗菌能力。因此抗菌肽rPaDef及改良肽的抗菌作用分子机制还需要更加深入的研究。

参考文献:

[1] GHARSALLAOUI A, OULAHAL N, JOLY C, et al. Nisin as a food preservative: Part I: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(8): 1262-1274.

[2] CEDERLUND A, GUDMUNDSSON G H, AGERBERTH B. Antimicrobial peptides important in innate immunity[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(20): 3942-3951.

[3] LIU Y, DING S Y, DIETRICH R, et al. Corrigendum: A biosurfactant-inspired heptapeptide with improved specificity to kill MRSA[J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 59(21):5651.

[4] HEUSER P, WOHLFAHRT G, SCHOMBURG D. Efficient methods for filtering and ranking fragments for the prediction of structurally variable regions in proteins[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004, 54(3): 583-595.

[5] JIANG H Y, BLOUIN C. Ab initio construction of all-atom loop conformations[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2006, 12(2): 221-228.

[6] WU Z B, HOOVER D M, YANG D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(15): 8880-8885.

[7] LEIPPE M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23(4/5): 267-279.

[8] SHANG D J, ZHANG Q, DONG W B, et al. The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria and endotoxin neutralization[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 33: 153-165.

[9] 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]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(1): 253-257.

[10] MUKHOPADHYAY J, SINEVA E, KNIGHT J, et al. Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel[J]. *Molecular Cell*, 2004, 14(6): 739-751.

[11] TANTONG S, PRINGSULAKA O, WEERAWANICH K, et al. Two novel antimicrobial defensins from rice identified by gene coexpression network analyses[J]. *Peptides*, 2016, 84: 7-16.

[12] FINDLAY B, ZHANEL G G, SCHWEIZER F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(10): 4049-4058.

[13] FIMLAND G, EIJSINK V G H, NISSEN-MEYER J. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9508-9515.

[14] KAZAZIC M, NISSEN-MEYER J, FIMLAND G. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P[J]. *Microbiology*, 2002, 148(7): 2019-2027.

[15] JU X R, CHEN X Q, DU L H, et al. Alanine-scanning mutational analysis of duracin GL reveals residues important for its antimicrobial activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(28): 6402-6409.

[16] DE OLIVEIRA CARVALHO A, GOMES V M. Plant defensins — prospects for the biological functions and biotechnological properties[J]. *Peptides*, 2009, 30(5): 1007-1020.

[17] HAWRANI A, HOWE R A, WALSH T R, et al. Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(27): 18636-18645.

[18] JIANG Z, KULLBERG B J, VAN DER LEE H, et al. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of alpha-helical antimicro-

- bial peptides[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2008, 72(6): 483-495.
- [19] LEE D G, HAHM K S, SHIN S Y. Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, P18, and its truncated peptides[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(4): 337-341.
- [20] AHN H S, CHO W, KANG S H, et al. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of alpha helical domain of Teneacin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study[J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 640-648.
- [21] GUZMÁN-RODRÍGUEZ J J, LÓPEZ-GÓMEZ R, SUÁREZ-RODRÍGUEZ L M, et al. Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *BioMed Research International*, 2023. (2013): 986273.
- [22] MENG D M, ZHAO J F, LING X, et al. Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 130: 90-99.
- [23] LIU Y F, LIU L J, YANG C L, et al. Molecular identification and antifungal activity of a defensin (PaDef) from spruce[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 41(2): 494-506.
- [24] ZHOU J F, LIU Y Q, SHEN T F, et al. Antimicrobial activity of the antibacterial peptide PMAP-36 and its analogues[J]. *Microbial-Pathogenesis*, 2019, 136: 103712.
- [25] RAMEZANZADEH M, SAEEDI N, MESBAHFAR E, et al. Design and characterization of new antimicrobial peptides derived from aurein 1.2 with enhanced antibacterial activity[J]. *Biochimie*, 2021, 181: 42-51.

责任编辑:王艳
收稿日期:2023-06-08