

两种合成抗菌肽的结构及抗菌作用机理

杨林, 范美华, 刘雪珠, 武梅, 石戈, 廖智

浙江海洋学院海洋科学学院 海洋生物资源及分子工程实验室, 舟山 316004

摘要: 为深入了解两种新型人工抗菌肽 mytilin-derived-peptide-1 (MDP-1) 和 mytilin-derived-peptide-2 (MDP-2) 的溶液结构和抗菌机理并探讨两种抗菌肽之间活性差异的结构基础, 采用二维核磁共振技术 (2-D NMR) 研究 MDP 分子的溶液结构; 采用透射电镜技术 (Transmitted electron microscopy, TEM) 研究 MDP 分子对于大肠杆菌和藤黄叠球菌的作用机理。研究表明, MDP-1 和 MDP-2 均采取了典型的 β -发夹结构, 其分子表面具有明显的疏水斑片, 其分子中碱性氨基酸突出于分子表面; 经 MDP 分子处理后的大肠杆菌以及藤黄叠球菌均出现细胞壁或细胞膜结构被破坏, 并出现膜壁分离以及细胞质内缩现象。我们认为, MDP-1 和 MDP-2 分子中的碱性氨基酸有助于 MDP 结合细菌表面的带负电荷的基团, 同时其分子表面的疏水斑片有助于其插入到细菌细胞膜内; 其疏水斑片面积以及碱性氨基酸在分子表面的拓扑结构差异是 MDP-1 和 MDP-2 活性差异的主要原因; 电镜实验结果表明 MDP-1 和 MDP-2 的主要靶标是细菌细胞壁以及细胞膜; 上述研究为深入了解 MDP 分子的结构与功能的关系以及将来基于 MDP 分子的药物研发奠定了基础。

关键词: mytilin-derived-peptide, 人工抗菌肽, 核磁共振, 溶液结构, 电镜分析

Solution structure and antibacterial mechanism of two synthetic antimicrobial peptides

Lin Yang, Meihua Fan, Xuezhu Liu, Mei Wu, Ge Shi, and Zhi Liao

Laboratory of Marine Biology and Molecular Engineering, College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China

Abstract: Mytilin-derived-peptide-1 (MDP-1) and mytilin-derived-peptide-2 (MDP-2) are two truncated decapeptides with reversed sequence synthesized corresponding to the residues 20-29 of mytilin-1 (GenBank Accession No. FJ973154) from *M. coruscus*. The objective of this study is to characterize the structural basis of these two peptides for their antimicrobial activities and functional differences, and to investigate the inhibitory mechanism of MDPs on *Escherichia coli* and *Sarcina lutea*. The structures of MDP-1 and MDP-2 in solution were determined by ^1H 2D NMR methods; the antibactericidal effects of MDPs on *E. coli* and *S. lutea* were observed by transmitted electron microscopy (TEM). Both MDP-1 and MDP-2 have a well-defined loop structure stabilized by two additional disulfide bridges, which resemble the-hairpin structure of mytilin-1 model. The surface profile of MDPs' structures

Received: April 15, 2011; Accepted: June 30, 2011

Supported by: Zhejiang Science and Technology Bureau (Nos. 2008C22026, 2009C32016).

Corresponding author: Zhi Liao. Tel/Fax: +86-580-2550826; E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn

浙江省科技厅面上科研农业项目 (Nos. 2008C22026, 2009C32016) 资助。

was characterized by protruding charged residues surrounded by hydrophobic residues. TEM analysis showed that MDPs destroyed cytoplasmic membrane and cell wall of bacteria and the interface between the cell wall and membrane was blurred. Furthermore, some holes were observed in treated bacteria, which resulted in cell death. Structural comparison between MDP-1 and MDP-2 shows that the distribution of positively charged amino acids on the loop of MDPs is topologically different significantly, which might be the reason why MDP-2 has higher activity than MDP-1. Furthermore, TEM results suggested that the bactericidal mechanisms of MDPs against *E. coli* and *S. lutea* were similar. Both MDP-1 and MDP-2 could attach to the negatively charged bacterial wall by positively charged amino acid residues and destroy the bacteria membrane in a pore-forming manner, thus cause the contents of the cells to release and eventually cell death.

Keywords: mytilin-derived-peptide, artificial antimicrobial peptides, nuclear magnetic resonance, solution structure, transmitted electron microscopy (TEM)

抗菌肽是生物体内广泛存在的一类多肽分子, 因其具有较强的抗菌活性, 稳定的结构以及不容易导致细菌产生耐药性等优点而成为目前新型生物抗生素的开发热点。贻贝抗菌肽是海洋生物抗菌肽研究中的一个重要内容, 其特殊的结构与广谱的抗菌功能使其具有重要的研究价值, 同时也具有开发成为新型生物抗生素的潜力^[1]。Mytilin 是贻贝抗菌肽中一个重要的家族, 由 34 个氨基酸组成, 分子中包含 4 对二硫键, 被认为是贻贝防御机制中最重要的—类抗菌肽分子^[2-4], 也是开发新型生物抗生素的先导分子。由于 mytilin 分子中含有 4 对二硫键, 因此, 对其进行大规模生产不论是基因重组表达还是固相化学合成均存在不小的困难, 这也妨碍了对其进一步开发。因此, 根据 mytilin 的空间结构以及其活性区域, 采取蛋白质工程手段对其进行分子重新设计和改造, 以获得具有较好抗菌活性并适合大规模生产的新型人工抗菌肽分子开展后续研究对于开发贻贝抗菌肽来源的新型生物抗生素具有重要的理论意义和应用价值。

在前期研究中, 我们根据厚壳贻贝 mytilin-1 (GenBank Accession No. FJ973155) 的活性区域 (20-29aa), 设计并合成了一对序列相反的新型人工抗菌肽, 分别为 MDP-1 和 MDP-2, 两者均为十肽, 分子中包含 2 对二硫键^[5]。由于 MDP 具有较短的序列和较好的抗菌活性, 因此有望开发成为一种新型抗生素。MDP-1 和 MDP-2 在抗菌试验中均表现出对革兰氏阳性菌以及阴性菌较强的抑制作用, 且两者

都均有极好的稳定性, 经 100 °C 水浴处理 30 min 或者经人血浆 37 °C 孵育 24 h 后, 其抑菌活性未见明显下降^[5]。在研究中, 我们发现尽管两者氨基酸组成完全一致, 仅仅只是序列相反, 但 MDP-2 的抑菌活性比 MDP-1 强 10 倍。为进一步了解 MDP 分子的结构与功能的关系, 我们采用 NMR 方法研究了其溶液结构; 同时, 采用透射电子显微镜 (Transmitted electron microscopy, TEM) 技术分析了大肠杆菌和藤黄叠球菌经 MDP 分子处理后的细胞结构变化。上述研究为了解 MDP 分子的抗菌机理以及开发 MDP 来源的生物抗生素奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 MDP 分子的固相化学合成

根据 MDP-1 的氨基酸序列 (Cys-Val-Cys-Phe-Gly-Arg-Arg-Cys-Ile-Cys) 以及 MDP-2 的氨基酸序列 (Cys-Ile-Cys-Arg-Arg-Gly-Phe-Cys-Val-Cys), 应用固相化学合成技术, 参照文献方法^[5]在 Tetras 多肽合成仪 (美国 ThuraMed 公司) 上进行。合成及复性后的多肽样品用反相高效液相色谱 (Waters 600E, 美国 Waters 公司) 纯化; 利用质谱 (Waters ZQ2000, 美国 Waters 公司) 分析目的峰的精确分子量, 通过与理论分子量的比较判断合成效果。

1.2 NMR 谱图的采集和处理

将 5 mg MDP 分子溶于 500 μ L 20 mmol/L 氘代醋酸钠缓冲液, 溶剂为水 (H_2O) 和重水 (D_2O) (9:1, V/V) 混和液, 含 0.01 mmol/L EDTA (消除顺

磁金属离子的影响) 及 20 mg/L NaN_3 (抑制细菌生长), 溶液 pH 值用 HCl 调至 5.0, 最后加入终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid (DSS) 作为化学位移内标。

在配备低温探头的 Bruker Avance 600 (美国 Bruker 公司) 型超导核磁共振仪上, 使用 XWINNMR 软件 (美国 Bruker 公司) 收集 2D NMR 数据。按照标准脉冲程序收集二维谱图, 预饱和和法抑制水峰。在相敏状态下用 TPPI 法 (Time-Proportional Phase Incrementation) 分别收集收集 DQF-COSY (Double Quantum Filtered-correlated Spectroscopy)、TOCSY (Total Correlated Spectroscopy)、以及 ROESY (Rotating Frame Nuclear Overhauser) 谱, 搜谱温度为 283 K。2D¹H-TOCSY 数据收集的混合时间分别为 50 ms、80 ms 和 100 ms; 2D¹H-ROESY 数据收集的混合时间分别为 150 ms、250 ms 和 350 ms。

应用 Felix 软件 (Biosym Technologies 公司), 在 O₂ SGI 图形工作站上分析和处理 NMR 数据。所有数据充零, 产生 1 024×512 数据。用相移为 $\pi/2$ 的正弦钟 (Sinebell) 窗函数处理谱图数据后, 进行傅立叶变换。所有二维谱图均以等高线图显示。

1.3 溶液结构计算

根据所获得 MDP 分子的 DQF、TOCSY、ROESY 图谱, 首先进行各质子的化学位移分析以及氢谱谱峰的完全归属。MDP 的氢谱谱峰的完全归属按照 Wüthrich 等发展的标准方法完成^[6-7], 包括从 DQF-COSY 和 TOCSY 谱图分辨识别自旋体系, 以及从 ROESY 谱图进行序列专一性的谱峰归属。序列专一性归属在混合时间 250 ms, 温度为 283 K 的 ROESY 谱中进行, 并参考混合时间为 150 ms 和 350 ms 的 ROESY 谱中的信息, 通过寻找 $d_{\alpha\text{N}}$ 、 $d_{\beta\text{N}}$ 、 $d_{\alpha\delta}$ 和 d_{NN} 等 NOE 联系, 按照 MDP 肽链的氨基酸序列将自旋体系连接起来。

距离约束通过分析 ROESY 谱的 NOE 交叉峰获得。根据各 NOE 交叉峰的强度及对应的质子间距离

可将 NOE 数据分为强、中和弱三类, 对应的距离上限为 2.7 Å、3.5 Å 和 5.0 Å, 下限定为 2 个质子的范德华半径之和 1.8 Å。亚甲基、甲基质子和苯环的氢质子用假原子 (Pseudo atoms) 代替, 按照 Wüthrich 等的方法^[7]加修正值。结构计算采用 CNS1.1 软件进行, 每个多肽计算 50 个结构。

1.4 电镜分析

参照文献方法^[8], 取对数生长期的大肠杆菌 *Escherichia coli* 和藤黄叠球菌 *Sarcina lutea*, 800×g 离心 10 min, 弃上清。无菌生理盐水洗涤, 用新鲜培养基稀释成 10⁸ 个/mL 的细菌悬液; MDP 分子用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液溶解, 溶解后的样品加入细菌悬液至样品终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加 0.2 mol/L 磷酸缓冲液。菌株置于恒温摇床 (150 r/min) 培养 2 h 后, 1 500×g 低温离心 10 min, 收集细菌, 菌体经无菌生理盐水洗涤 2 次后以 3% 的异戊醛固定 2~4 h, 之后用 pH 7.2 的磷酸缓冲液洗涤 2 次, 再用 1% 锇酸固定 1 h, 经树脂包埋, 超薄切片后放置铜网中, 采用 JEM-1230 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司) 进行观察拍照。

2 结果

2.1 MDP 分子的氢谱完全归属和结构计算

利用固相化学合成法成功获得 MDP-1 和 MDP-2; 采用 NMR 方法分别收集 MDP-1 和 MDP-2 的 DQF、TOCSY 和 ROESY 谱图。图 1 显示了 MDP-1 和 MDP-2 的 TOCSY 和 ROESY 谱图, 自旋体系的识别参照 Wüthrich 等发展的标准方法^[7]完成。MDP-1 和 MDP-2 各质子的化学位移见表 1。所有主链质子和超过 90% 的侧链质子得到指认。

从 50 个起始结构开始通过上述计算得到的 NOE 约束违反小于 0.5 Å 和二面角约束违反小于 2° 的 46 个结构较好地收敛为一个相同的折叠。根据 RMSD 值、Ramachandran 图和能量等指标从这 46 个结构中挑选出 10 个较好的结构代表 MDP 的溶液

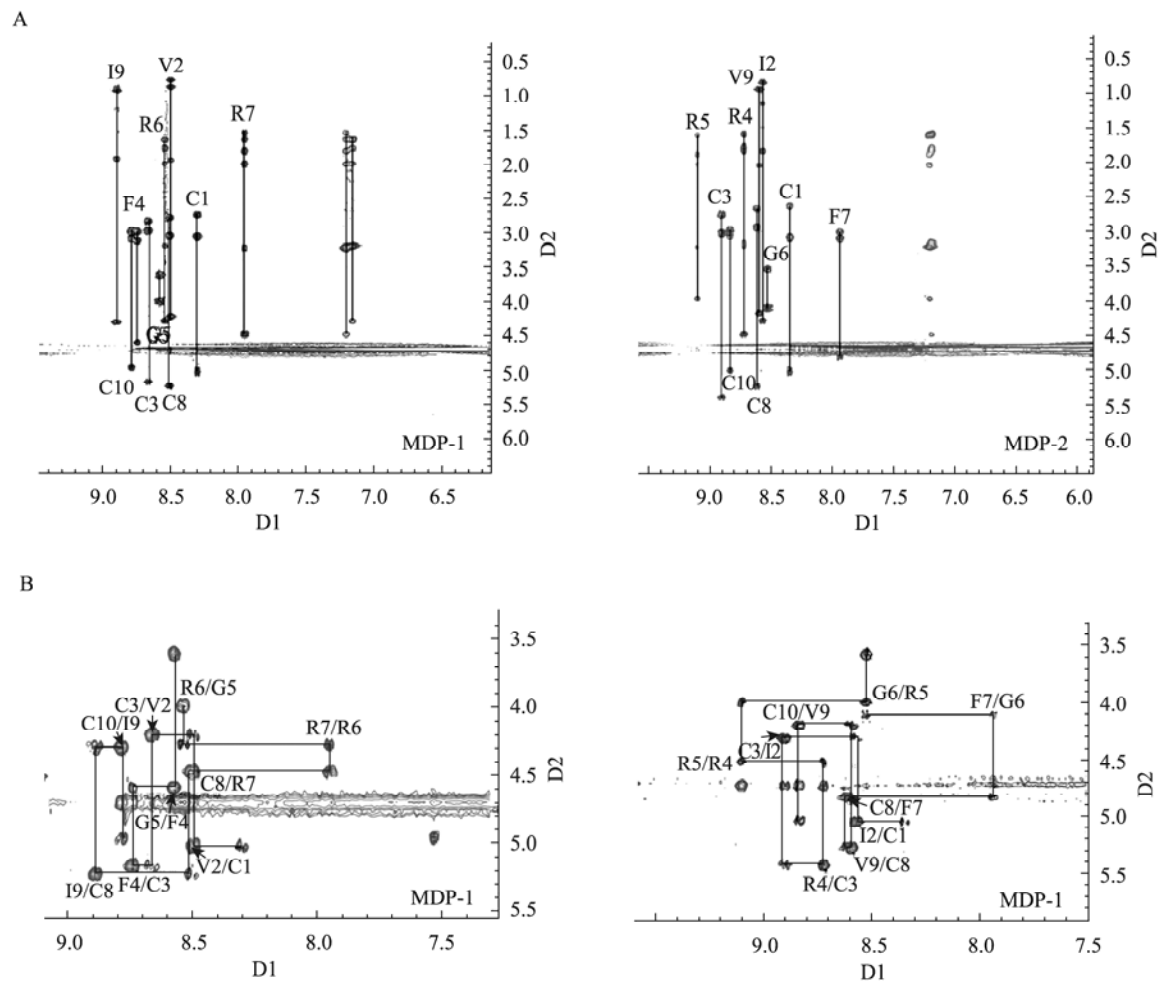


图1 MDP分子的 TOCSY 和 ROESY 指纹区图谱

Fig. 1 TOCSY and ROESY spectra of MDPs. (A) TOCSY spectra of MDP-1 and MDP-2 measured at 283 K and mixing time of 85 ms, showing the assignments of all residues side-chain connectivity. (B) NH- α H and NH-NH regions of ROESY NMR spectrum of MDP-1 and MDP-2 measured at 283 K and mixing time of 250 ms, showing intra-residue and sequential connectivity for each residue in the amino acid sequence.

三维结构。MDP 的 10 个结构与理想的共价几何 RMSD 值无显著背离; 与实验约束的违反小, 满足实验约束; 平均 Lennard-Jones 势能值小, 表明非键接触 (Non-bonded contacts) 良好。

2.2 MDP 分子的结构描述

图 2 分别展示了 MDP-1 和 MDP-2 的 10 个结构所有非氢原子叠合图以及主链叠合图, 由图可见, MDP-1 和 MDP-2 均采取了 β -发夹的结构, 分子中存在一个转角 (Turn) 区域 (MDP-1 分子为

Phe5-Arg8; MDP-2 分子为 Arg5-Phe8), 整个分子由两对二硫键稳定。MDP-1 分子的 10 个结构的主链原子 (N、C α 、C) 的 RMSD 值为 (0.36 ± 0.12) Å; MDP-2 的 10 个结构的主链原子的 RMSD 值为 (0.50 ± 0.13) Å, 表明这 MDP 分子的溶液结构整体收敛性较好。图 3 展示了 MDP 分子的表面结构, 由图 3 可见, MDP-1 和 MDP-2 的分子表面均存在一个由 Phe、Val 和 Ile 三种疏水性残基构成的疏水斑片, 在该疏水斑片的另一侧有 2 个 Arg 残基, 其侧链突

出于分子表面,而2对二硫键主要包埋于分子内部。

应用 PROCHECK^[9]程序对 MDP-1 和 MDP-2 的结构进行了检查,结果表明 MDP-1 和 MDP-2 的分子结构中,超过 85%的质子处于最佳区和可允许区,说明所计算的 MDP 的结构非键合原子间无过近接触,符合立体化学最小接触距离的要求。

2.3 MDP 分子的抑菌作用的电镜分析

在前期研究中,MDP-1 对大肠杆菌以及藤黄叠球菌的最低抑菌浓度分别为 12.5~25 $\mu\text{mol/L}$ 和 100~200 $\mu\text{mol/L}$; 而 MDP-2 对大肠杆菌以及藤黄叠球菌的最低抑菌浓度分别为 12.5~25 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.7~6.5 $\mu\text{mol/L}$ ^[5]; 鉴于 MDP-1 和 MDP-2 对大肠杆

菌和藤黄叠球菌均有明显抑制作用,因此,采用大肠杆菌和藤黄叠球菌为指示菌,分别经 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MDP 处理 2 h 后,经透射电镜观察发现,正常生长的大肠杆菌和藤黄叠球菌除核区外,细胞内容物呈均匀分布,且膜壁紧密结合,界限清楚;而经 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MDP 处理 2 h 后的大肠杆菌和藤黄叠球菌在细胞形态方面产生较大变化。由图 4 可见,大肠杆菌分别经 MDP-1 和 MDP-2 处理后,细胞表面出现纤毛状突起,细胞均出现孔洞,且出现细胞质内缩现象;而藤黄叠球菌分别经 MDP-1 和 MDP-2 处理后,其细胞壁受到破坏,且膜壁界限模糊,出现细胞质内缩现象。

表 1 MDP-1 和 MDP-2 的质子化学位移

Table 1 Proton chemical shifts of MDP-1 and MDP-2

Peptide	Residues	HN	H α	H β	Others
MDP-1					
	Cys1	8.309	5.021	2.748; 3.046	
	Val2	8.509	4.206	1.932	HG: 0.873; 0.772
	Cys3	8.670	5.176	2.843; 2.964	
	Phe4	8.750	4.599	3.134; 3.002	HZ: 7.215
	Gly5	8.571	3.984; 3.588		
	Arg6	8.547	4.278	2.003; 1.768	HG1: 1.644; HD2: 3.195; HH: 7.161; 7.532
	Arg7	7.960	4.480	1.990; 1.808	HG: 1.635; 1.530; HD2: 3.221; HH: 7.197
	Cys8	8.517	5.236	3.034; 2.785	
	Ile9	8.901	4.299	1.912	HG: 1.511; 1.201; HD2: 0.930
	Cys10	8.773	4.960	3.081; 2.988	
MDP-2					
	Cys1	8.343	5.021	3.115; 2.659	
	Ile2	8.559	4.284	1.833	HG: 1.492; 1.166; HD: 0.865
	Cys3	8.888	5.399	3.025; 2.783	
	Arg4	8.727	4.486	1.806	HG: 1.593; HH: 7.172; 7.478
	Arg5	9.106	3.974	2.029; 1.896	HG: 1.608; HD: 3.228
	Gly6	8.531	4.12; 3.577		
	Phe7	7.935	4.799	3.097; 3.027	HD: 7.233; HE: 7.304
	Cys8	8.608	5.236	3.034; 2.785	
	Val9	8.517	4.178	2.035	HG: 0.950
	Cys10	8.846	5.002	3.063; 3.003	

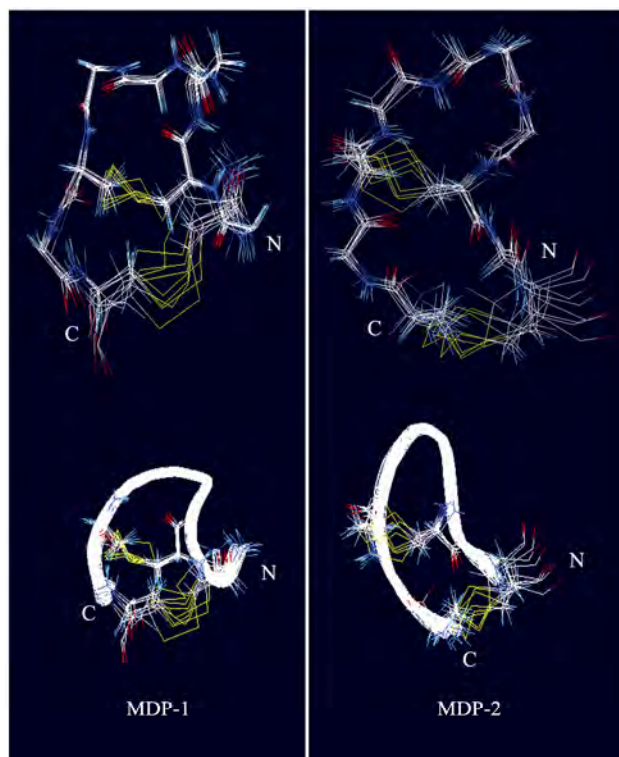


图 2 MDP-1 和 MDP-2 所有非氢原子叠合图以及主链叠合图

Fig. 2 Solution structural characterization of MDP-1 and MDP-2 showing the ensembles of 10 representative backbone atoms and ribbon conformers of the backbone peptide folding of MDP-1 and MDP-2, respectively; the two disulfide bonds are displayed by yellow lines; the N- and C-terminal of peptides were labeled by "N" and "C", respectively.

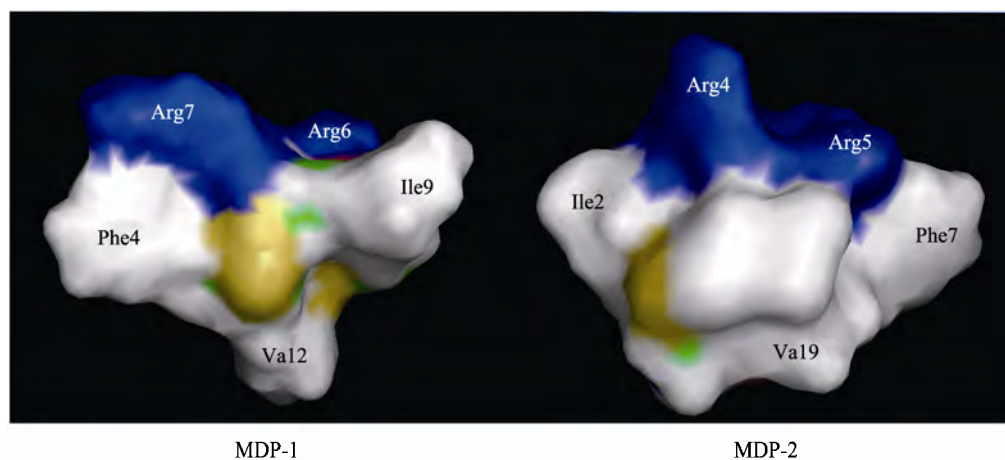


图 3 MDP-1 和 MDP-2 的分子表面结构图

Fig. 3 Surface profile of MDP-1 and MDP-2. Hydrophobic residues are colored white, basic residues are colored blue, disulfide bonds are colored yellow.

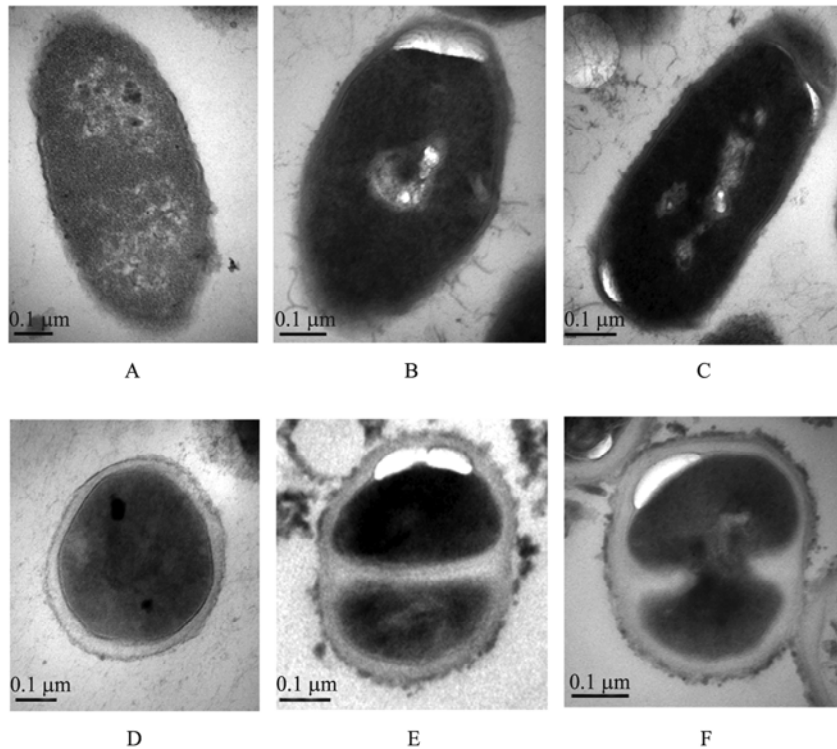


图4 大肠杆菌及藤黄叠球菌经MDP分子处理后的透射电镜图

Fig. 4 Transmission electron micrographs of *E. coli* and *S. luteus* untreated or treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ MDPs. A and D represent control *E. coli* and *S. luteus*, respectively; B and C represent *E. coli* treated with MDP-1 (100 $\mu\text{mol/L}$) and MDP-2 (100 $\mu\text{mol/L}$), respectively; E and F represent *S. luteus* treated with MDP-1 (100 $\mu\text{mol/L}$) and MDP-2 (100 $\mu\text{mol/L}$), respectively.

3 讨论

抗菌肽作为先天免疫系统的重要组成部分对于生物免疫具有重要的作用。至今，在数据库中可检索的各类抗菌肽已经超过 1 700 种。已报道了空间结构的超过 220 种 (<http://aps.unmc.edu/AP/about.php>), 其结构主要分为 α -螺旋和 β -折叠两类。根据抗菌肽的结构特点合成人工抗菌肽是目前抗菌肽开发的重要途径^[10]。目前已有许多证据表明，具有 β -折叠结构的抗菌肽分子，其抗菌功能相关的活性区域为分子中的 β -发夹结构，而根据这一结构特点设计并合成的人工抗菌肽也大量报道^[11-13]。目前，具有这一结构特点的抗菌肽已经在临床上获得应用，例如，基于抗菌肽 Protegrin-1 设计合成具有 β -发夹结构的人工抗菌肽 Isegranin 已被应用于临床三期^[14]。在我们前期的研究中，根据厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 的 β -

发夹结构所在的区域 (20-29aa) 设计并合成的一对序列相反的新型人工抗菌肽 MDP-1 和 MDP-2 也显示出较好的抑菌活性^[5]。上述研究表明，具有 β -折叠结构的抗菌肽分子，其结构中的 β -发夹结构区域可以作为设计新型人工抗菌肽的分子模板。但目前对于这类人工抗菌肽的溶液结构研究尚不多见，因此，我们采取 NMR 技术对前期研究中获得的人工抗菌肽 MDP-1 和 MDP-2 进行了结构分析。

通过研究，我们发现 MDP-1 和 MDP-2 在水溶液中均采取了典型的 β -发夹结构，分子中的 2 对二硫键很好地稳定了该结构。Kini 等曾提出，具有膜结合活性的多肽，其分子表面均存在一个对称分布的由疏水性氨基酸残基组成的疏水斑片和由带电荷氨基酸残基组成的亲水区域^[15]。 β -发夹结构的抗菌肽分子表面的疏水斑片被认为有助于抗菌肽分子插入到细菌细胞膜内并通过疏水作用力与细菌细胞膜

产生结合^[16-18]。同时, 已有证据表明, 具有 β -发夹结构的抗菌肽 (如 β -防御素等) 能够在平面脂双层模型上形成跨膜孔道并诱导细胞内的离子外流^[19-20]。从 MDP-1 和 MDP-2 的分子表面结构来看, 两者均有一个由疏水氨基酸形成的疏水斑片, 而带正电荷的 Arg 分布于该疏水斑片的另一侧且突出于分子表面 (图 4), 这种结构特征类似于其他 β -发夹结构的抗菌肽。也能够解释 MDP 所具有的抗菌活性。为进一步了解 MDP 分子的抑菌机制, 我们采用透射电镜观察了 MDP 分子处理大肠杆菌以及藤黄叠球菌后的细胞形态变化。通过电镜观察我们发现, 大肠杆菌分别经 MDP-1 和 MDP-2 处理后, 细胞表面均出现纤毛状突起, 细胞出现孔洞, 且出现细胞质内缩现象; 而藤黄叠球菌分别经 MDP-1 和 MDP-2 处理后, 其细胞壁受到明显破坏, 并出现细胞质内缩现象。Friedrich 等根据不同结构类型的抗菌肽与细菌作用的电镜分析结果认为, 富含阳离子的抗菌肽首先与细菌细胞壁产生结合, 之后通过影响细菌细胞膜导致细菌内产生中间体 (Mesosome) 结构并导致细胞内容物释放而死亡^[8]。尽管本次研究中我们未能在电镜下明确观察到细菌中间体结构的形成, 但根据上述研究结果以及 Friedrich 等的观点, 我们推测 MDP-1 和 MDP-2 对于大肠杆菌和藤黄叠球菌均通过影响

其细胞壁和细胞膜结构, 导致细胞表面结构的破裂, 并最终导致细胞内容物外流而杀死细菌。

虽然 MDP-1 和 MDP-2 具有类似的结构与功能, 但我们在研究中发现, MDP-2 的抑菌活性要比 MDP-1 强约一个数量级^[5]。通过比较 MDP-1 和 MDP-2 的空间结构, 我们认为, 导致 MDP-2 活性较强的因素可能来自两个方面。首先 MDP-2 的疏水斑片的表面积明显要比 MDP-1 大, 通过 Molmol 软件分析, 我们发现, MDP-2 的疏水斑片的溶液可及性表面积为 548.2 \AA^2 , 而 MDP-1 的疏水斑片的溶液可及性表面积为 328.6 \AA^2 , 较大的疏水斑片面积可能导致 MDP-2 与细菌细胞膜有更强的疏水结合力; 其次, MDP-2 与 MDP-1 分子中 2 个带正电荷的 Arg 在分子表面的拓扑结构也存在明显差异, 如图 5 所示, MDP-2 的 2 个 Arg 分布于 Turn 区域的同一侧, 而 MDP-1 的 2 个 Arg 分布于 Turn 区域的不同侧, 由此造成 MDP-2 分子表面的正电荷较 MDP-1 分子更为集中; 此外, 通过和天然 mytilin 分子中 β -发夹结构区域的空间结构比较, 我们发现, MDP-2 的 Arg 分布特征类似于天然 mytilin 分子, 而 MDP-1 的两个 Arg 残基的空间分布与天然 mytilin 有较大差异。在此前的研究中, β -发夹结构的抗菌肽在其 Turn 区域均发现存在带正电荷的碱性氨基酸残基, 例如,

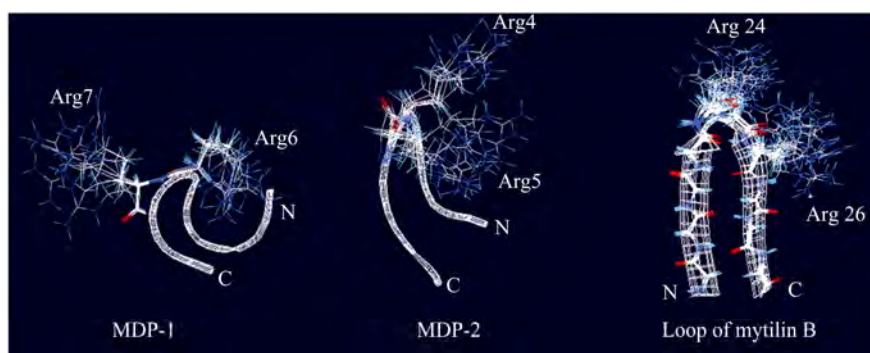


图 5 MDP-1、MDP-2 以及 mytilin B (PDB 编号 2EEM) 的 β -发夹结构比较

Fig. 5 Structural comparison of MDP-1 and MDP-2 with the β -hairpin region of mytilin B (PDB code: 2EEM), the two interesting Arg in MDP-1, MDP-2, and β -hairpin region of mytilin B are highlighted.

抗菌肽 Protegrin-1 (β -发夹区域序列为: CYCRRRFCVC)^[12], 抗菌肽 Tachyplesin-1 (β -发夹区域序列为: CYRGIC)^[17], 以及抗菌肽 Polyphemusin-1 (β -发夹区域序列为: CYRGFC)^[21]等。位于 β -发夹结构中 Turn 区域的带正电荷氨基酸被认为是该类型结构抗菌肽分子用以与细菌细胞壁以及细胞膜的带负电荷基团之间通过电荷吸引力产生结合的关键残基^[22-24]。结合上述观点以及 MDP 分子的结构比较, 我们认为 MDP-2 和 MDP-1 分子表面的疏水斑片面积以及 Arg 残基的拓扑结构差异可能是导致两者活性差异的主要原因。

通过上述研究, 我们对两种新型人工抗菌肽 MDP-1 和 MDP-2 的溶液结构以及可能的抗菌机理进行了分析, 并对 MDP 分子结构与功能的关系进行了探讨。对于抗菌肽的结构与功能关系的研究有助于人们在天然抗菌肽的基础上设计具有更好的活性、稳定性以及特异性的多肽, 从而为开发抗菌肽来源的新型生物抗生素奠定基础。

REFERENCES

- [1] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett*, 2000, 486(3): 185-190.
- [2] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem*, 1996, 271: 21808-21813.
- [3] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Involvement of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12954-12962.
- [4] Mitta G, Vandenbulcke F, Noël T, et al. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J Cell Sci*, 2000, 113(15): 2759-2769.
- [5] Liu M, Wu M, Zhou SQ, et al. Designation, solid-phase synthesis and antimicrobial activity of Mytilin derived peptides based on Mytilin-1 from *Mytilus coruscus*. *Chin J Biotech*, 2010, 26(4): 550-556.
- 刘梅, 武梅, 周世权, 等. 基于厚壳贻贝 Mytilin-1 的抗菌肽设计, 固相合成及抗菌谱分析. *生物工程学报*, 2010, 26(4): 550-556.
- [6] Wüthrich K. *NMR of Protein and Nucleic Acids*. New York: John Wiley and Sons, 1986.
- [7] Wüthrich K. Sequential individual resonance assignments in the ¹H-NMR spectra of polypeptides and proteins. *Biopolymers*, 1983, 22(1): 131-138.
- [8] Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, et al. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on grampositive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(8): 2086-2092.
- [9] Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, et al. AQUA and PROCHECK- NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, 1996, 8(4): 477-486.
- [10] Lu YJ, Wang H, Qu XM. Study on solid-phase synthesis, purification and the relation between structure and function of the antibacterial peptides. *Chin J Biotech*, 1997, 13(1): 35-41.
- 陆莹瑾, 王禾, 屈贤铭. 抗菌肽的固相合成, 分离纯化与构效关系的研究. *生物工程学报*, 1997, 13(1): 35-41.
- [11] Chiou PP, Lin CM, Perez L, et al. Effect of cecropin B and a synthetic analogue on propagation of fish viruses *in vitro*. *Mar Biotechnol*, 2002, 4(3): 294-302.
- [12] Tamamura H, Murakami T, Horiuchi S, et al. Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(5): 853-858.
- [13] Shankaramma SC, Athanassiou Z, Zerbe O, et al. Macrocyclic hairpin mimetics of the cationic antimicrobial peptide protegrin I: a new family of broad-spectrum antibiotics. *Chembiochem*, 2002, 3(11): 1126-1133.
- [14] Giles FJ, Rodriguez R, Weisdorf D, et al. A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, study of iseganan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy. *Leuk Res*, 2004, 28(6): 559-565.
- [15] Kini MR, Evans HJ. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int J Pept Protein Res*, 1989, 34(4): 277-286.
- [16] White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5(4): 521-527.
- [17] Doherty T, Waring AJ, Hong M, et al. Peptide-lipid interactions of the beta-hairpin antimicrobial peptide

- tachyplesin and its linear derivatives from solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9): 1285–1291.
- [18] Powers JP, Tan AM, Ramamoorthy A, et al. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*, 2005, 44(47): 15504–15513.
- [19] Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, 1993, 2(8): 1301–1312.
- [20] Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*, 1994, 3(9): 1362–1373.
- [21] Masuda M, Nakashima H, Ueda T, et al. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189(2): 845–850.
- [22] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 55–70.
- [23] Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 1–10.
- [24] Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, et al. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*, 2000, 79(4): 2002–2009.



《生物工程学报》创刊以来全部论文数据库上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 《生物工程学报》对 1985 年创刊以来的全部论文进行了数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库。检索或浏览我刊已发表的论文请从我刊首页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>) “过刊检索”进入, 可以按照题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息检索, 欢迎浏览下载。