

# 基于厚壳贻贝 Mytilin-1 的抗菌肽设计、固相合成及抗菌谱分析

刘梅<sup>1</sup>, 武梅<sup>1</sup>, 周世权<sup>2</sup>, 高鹏<sup>1</sup>, 鲁涛<sup>1</sup>, 王日昕<sup>1</sup>, 石戈<sup>1</sup>, 廖智<sup>1</sup>

1 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 316000

2 舟山医院-中科院北京基因组研究所免疫基因组学联合实验室, 舟山 316004

**摘要:** 贻贝抗菌肽 Mytilin 是贻贝免疫系统的重要组成部分, 对其结构与功能的研究表明, 其序列中连接两段  $\beta$ -折叠的发夹区域是其抗菌功能的关键所在。为验证该区域是否具有抗菌活性, 通过对厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 抗菌肽 Mytilin 进行空间结构模拟, 选取其中  $\beta$ -发夹部分肽段, 采用了固相化学合成的方法合成了两条 10 肽, 分别命名为 Mytilin Derived Peptide-1 (MDP-1) 和 Mytilin Derived Peptide-2 (MDP-2)。高效液相色谱以及质谱检测结果表明, 合成是成功的。抗菌谱研究表明, MDP-1 和 MDP-2 对革兰氏阳性菌、阴性菌以及真菌均具有明显的抑制作用, 同时, 合成的 MDP 由于序列短且有两对二硫键, 因此对于温度及人血浆均表现出很强的稳定性。上述研究结果为深入了解厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的抗菌机制以及在此基础上开发具有应用价值的新型抗菌肽奠定了基础。

**关键词:** Mytilin, MDP, 固相化学合成, 抗菌谱

## Designation, solid-phase synthesis and antimicrobial activity of Mytilin derived peptides based on Mytilin-1 from *Mytilus coruscus*

Mei Liu<sup>1</sup>, Mei Wu<sup>1</sup>, Shiquan Zhou<sup>2</sup>, Peng Gao<sup>1</sup>, Tao Lu<sup>1</sup>, Rixin Wang<sup>1</sup>, Ge Shi<sup>1</sup>, and Zhi Liao<sup>1</sup>

1 Laboratory of Marine Living and Molecular Engineering, College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China

2 Joint Laboratory of Immunogenomics, Zhoushan Hospital-BIG/CAS, Zhoushan Hospital, Zhoushan 316004, China

**Abstract:** As a key role in mussel defense system, Mytilin is an important antibacterial peptide isolated from the mussel serum. The structural and functional researches on Mytilin showed that the fragment connecting two  $\beta$ -sheets in a stable  $\beta$ -hairpin structure was probably required for antimicrobial activity. To elucidate the structural features and the antimicrobial activity of this fragment, we re-designed and synthesized two peptides corresponding to the main mimic structures of Mytilin-1 from *Mytilus coruscus*, we named these two peptides Mytilin Derived Peptide-1 and Mytilin Derived Peptide-2, respectively. Using a liquid growth inhibition assay, we evaluated their activity towards Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungus. The results showed that both peptides

**Received:** October 26, 2009; **Accepted:** March 18, 2010

**Supported by:** National Key Technology R&D Program of China (No. 2007BAD43B08), General Agricultural Programs of Science and Technology Commission Foundation of Zhejiang Province (Nos. 2008C22026, 2009C32016), the Seeding Grants Programs of Science and Technology Commission Foundation of Zhejiang Province (No. 2008R40G2110003), the Projection of Zhoushan Technical Bureau (No. Y20082080).

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

国家科技支撑计划 (No. 2007BAD43B08), 浙江省科技厅面上科研农业项目 (Nos. 2008C22026, 2009C32016), 浙江省科技厅新苗人才计划项目 (No. 2008R40G2110003), 浙江省舟山市科技局计划项目 (No. Y20082080) 资助。

can inhibit the growth of Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungus. Besides, these two peptides showed high stability in heat water and human serum. These works laid the foundation for further research on the molecular mechanism of Mytilin and for further exploitation of antibacterial peptides with lower molecular mass and more stable structure.

**Keywords:** Mytilin, Mytilin derived peptide (MDP), solid-phase synthesis, antimicrobial activity

贻贝抗菌肽是海洋生物抗菌肽研究中的一个重要内容, 其特殊的结构与高效的抗菌功能使其具有重要的理论研究价值, 同时也具有开发成为新型生物抗生素的潜力<sup>[1]</sup>。Mytilin 是贻贝抗菌肽家族中的一类重要成员, 目前已从不同种的贻贝中分离纯化到 5 种 Mytilin 分子, 分别为 MytilinA、B、C、D 和 G1<sup>[2-3]</sup>, 是目前贻贝抗菌肽研究中发现成员最多的家族。鉴于其在贻贝血清中的高丰度以及在体外抗菌实验中表现出的高效抗菌功能, Mytilin 被认为是贻贝防御机制中最重要的一类抗菌肽分子<sup>[4]</sup>。

抗菌肽的抗菌功能与其空间结构具有密切关系, 因此, 针对抗菌肽的结构研究一直受到人们的关注, 也是深入了解抗菌肽结构与功能的关系及其抗菌机制的关键所在。Roch 等最近对来自地中海贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 的 Mytilin B 进行了核磁共振研究<sup>[5]</sup>, 结果表明, Mytilin B 的结构属于典型的二硫键稳定的  $\alpha/\beta$  结构 (Cysteine-stabilized- $\alpha/\beta$ ), 分子中包含有一段  $\alpha$ -螺旋和两段  $\beta$ -折叠片, 由 4 对二硫键稳定整个结构。该结构类型既不属于抗菌肽常见的  $\alpha$ -螺旋结构, 也不属于单纯  $\beta$ -折叠型抗菌肽结构, 是一类比较特殊的空间结构, 且该结构类似于 Yang 等早期解析的贻贝防御素 MGD-1 的空间结构<sup>[6]</sup>。而通过对 MGD-1 的结构与功能的研究, Romestand 等认为由两段  $\beta$ -折叠片及连接这两段  $\beta$ -折叠片的环 (Loop) 上的带正电荷的氨基酸残基是贻贝抗菌肽发挥抗菌活性的关键部位<sup>[7]</sup>。

厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 是我国具有重要经济价值的养殖贻贝之一, 在前期的研究中, 本研究室已从厚壳贻贝血清中分离纯化到一种 Mytilin, 命名为 Mytilin-1 (GenBank Accession No. FJ973154), 该抗菌肽分子量为 3885.3 Da, 含 34 个氨基酸残基, 其中包括 8 个半胱氨酸并形成 4 对二硫键。体外抗菌实验中, Mytilin-1 对藤黄叠球菌 *Sarcina luteus* 及大肠杆菌 *Escherichia coli* 均具有明显的抑制作用<sup>[8]</sup>。

为进一步了解厚壳贻贝 Mytilin-1 的结构与功能的关系, 鉴于厚壳贻贝 Mytilin-1 与地中海贻贝的 Mytilin B 具有较高的序列相似性 (64%), 本实验以地中海贻贝 Mytilin B (PDB 编号: 2EEM) 为模板, 对厚壳贻贝 Mytilin-1 进行了空间结构模拟。根据结构模拟结果发现, 厚壳贻贝 Mytilin-1 同样具有两段  $\beta$ -折叠片及连接这两段  $\beta$ -折叠片的环 (Loop), 且环上分布有碱性氨基酸残基 (Arg), 为验证该区域是否为 Mytilin-1 的活性位点, 根据该部位的氨基酸序列和结构特点, 人工设计并合成了两条新的多肽, 分别命名为 Mytilin Derived Peptide-1(MDP-1) 和 Mytilin Derived Peptide-2(MDP-2), 并对其抗菌谱做了分析。上述研究为深入了解厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的结构与功能的关系, 以及在此基础上进行新型抗菌肽分子的设计和改造奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

9-芴甲氧羰基(Fmoc) 氨基酸、侧链保护基 Cys (Acm)、Cys(Trt)、二氯甲烷(DCM)、二异丙基乙胺 (DIEA)、1-羟基-苯并-三氮唑(HOBT)、1-氧-3-双二甲胺羰基苯并三氮唑四氟化硼盐(TBTU)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 为上海吉尔公司的产品。N-甲基吗啉 (NMM)、哌啶(Piperidine)、Fmoc-Rink-AM-Resin 树脂、三氟乙酸(TFA)、苯并三唑四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU)、1-羰基苯并四唑(HOBT) 均为 Sigma 公司产品。乙腈购自美国 TEDIA 公司。其他试剂均为国产色谱纯试剂。实验用去离子水由 Millipore synergy 纯水系统 (美国 Millipore 公司) 制取。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 厚壳贻贝 Mytilin-1 的结构模拟及多肽设计

利用结构模拟软件 ESyPred3D<sup>[9]</sup>, 以地中海贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 的 Mytilin B (PDB 编号: 2EEM) 为模板, 对厚壳贻贝 Mytilin-1 进行空间结

构模拟, 获得厚壳贻贝 Mytilin-1 主链的空间结构。根据 Mytilin-1 的空间结构, 选择 20 号丙氨酸 (Ala20) 到 29 号半胱氨酸 (Cys29) 之间的 10 肽片段, 将 Ala20 及 Ser22 分别替换成 Cys, 获得一条新的多肽, 命名为 MDP-1, 该多肽的 N 端设计为乙酰化, C 端设计为酰胺化以去除末端电荷, 其序列为 Ac-Cys-Val-Cys-Phe-Gly-Arg-Arg-Cys-Ile-Cys-NH<sub>2</sub>; 同时, 另外设计了一条反向序列, 命名为 MDP-2, 其序列为 Ac-Cys-Ile-Cys-Arg-Arg-Gly-Phe-Cys-Val-Cys-NH<sub>2</sub> (图 1)。

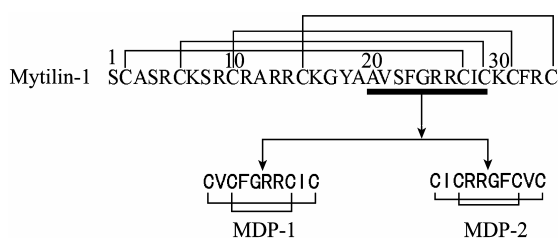


图 1 厚壳贻贝 Mytilin-1 的序列及衍生多肽 (MDP-1 和 MDP-2) 的设计

Fig. 1 Amino acid sequences of Mytilin-1 from *Mytilus coruscus* and derived peptides based on selected fragments.

### 1.2.2 MDP-1 及 MDP-2 的固相合成、复性及纯化

应用固相合成法 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS), 利用 Fmoc-Cys(Trt)-OH (Cys1 和 Cys4) 和 Fmoc-Cys (Acm)-OH (Cys2 和 Cys3) 的不同性质, 分别利用三苯甲基(Trt) 和乙酰氨基甲基(Acm) 保护作为一对要形成二硫键的 Cys 合成出所需线性多肽, 结合分步去保护和复性以便二硫键的正确配对 (Cys1-Cys4, Cys2-Cys3)。

多肽合成参照文献[9]的方法在 Tetras 多肽合成仪 (美国 ThuraMed 公司) 上进行, 基本流程为: Fmoc-Rink-AM-Resin 树脂以 DCM 进行充分溶胀; 取第 1 个 Fmoc-氨基酸于 DCM 中溶解, 再加入 DIEA 混合后加入反应容器中, 吹 N<sub>2</sub> 反应 2 h, 将反应液过滤除去加入甲醇, 封闭反应 1 h 后分别用 DCM、异丙醇及 DMF 洗涤树脂; 之后用 20% 哌啶脱 Fmoc, 经 DMF 充分洗涤后, 加第 2 个氨基酸与 HOBt 及 DIEA 混合后进行偶联, 反应 1 h 后, 用茚三酮检测, 树脂无色透明为反应完全, 然后以 DMF 充分洗涤; 重复上述步骤直到最后一个氨基酸反应完全。利用

K 试剂 (K Reagent, 含 82.5% 的 TFA, 5% 的苯酚, 5% 的苯甲硫醚, 以及 2.5% 的巯基乙醇的水溶液) 对合成后的多肽进行侧链去保护以及从树脂上切割。

获得的合成粗品首先在 90% TFA 中反应 2 h, 以去除 Cys1 和 Cys4 的保护基团 Trt, 之后利用双氧水进行氧化复性, 以确保 Cys1 和 Cys4 之间形成二硫键; 第一对二硫键形成后的粗品经高效液相色谱纯化并经质谱检测以确定第一对二硫键正确形成, 之后分别以碘/甲醇/DMF 混合溶液及抗坏血酸进行 Cys2 和 Cys3 的保护基团 Acm 的去除以及复性, 以形成第二对二硫键。复性完全后的多肽样品用反相高效液相色谱纯化 2 次。第一次纯化: Sunfire C18 柱 (10 mm×250 mm, Waters), 洗脱梯度: 0~40 min, 5%~30% 乙腈 (含 0.1% TFA); 第二次纯化: Vydac C18 柱 (4.6 mm×250 mm), 洗脱梯度: 0~40 min, 5%~20% 乙腈 (含 0.1% TFA)。

用 Waters ZQ2000 质谱仪分析目的峰的精确分子量, 质谱检测条件为毛细管电压: 3.50 kV; 锥孔电压: 35 V; 干燥气流速: 500 L/h; 离子源温度: 120°C; 辅助气温度: 380°C; 离子检测方式: 选择性离子检测 (SIM); 离子极性: 正离子 (Positive); 离子化方式: 气动辅助电喷雾离子化 (ESI)。

### 1.2.3 抗菌谱分析

根据文献方法<sup>[3]</sup>, 采用培养基倍比稀释法测定 MDP-1 和 MDP-2 抗菌活性。细菌用 Poor-Broth 液体培养基培养至对数生长期, 然后用相应培养基稀释至 A<sub>630</sub> 为 0.001; 在预先经灭菌处理的 96 孔板中每个孔加入 90 μL 菌液。多肽以灭菌处理后的纯水溶解, 最高浓度为 1 mmol/L, 然后倍比稀释, 最低浓度为 5 μmol/L, 以纯水作为阴性对照, 将各浓度多肽溶液加入 96 孔板中, 10 μL/孔, 并以经灭菌处理的锡箔纸覆盖 96 孔板, 以防止培养过程中的杂菌污染。

将 96 孔板在振荡器上轻柔振荡使样品和菌液充分混合, 置于摇床 (转速为 200 r/min) 37°C 培养 16~24 h。采用酶标仪测定每个孔的 OD 值以衡量多肽对于细菌生长的抑制作用, 每种细菌平行做 3 次重复。多肽的最低抑制浓度 (Minimal inhibitory concentrations, MIC) 用 [a]-[b] 表示, 其中 [a] 代表

细菌继续生长的最大浓度, 而[b]代表细菌完全被杀灭的最低浓度。抗真菌试验与上述基本相同, 只是真菌在 Sabourand 液体培养基中 30℃ 培养 48 h 后检测。

### 1.2.4 MDP-1 和 MDP-2 的稳定性分析

将 MDP-1 和 MDP-2 分别于 30℃、60℃ 和 90℃ 水浴中加热 30 min (样品浓度为 100 μmol/L), 热处理后的样品以 0.22 μm 针头过滤器过滤; 以藤黄叠球菌 *S. luteus* 为指示菌检测经热处理后的抗菌肽的抑菌活性, 以不经热处理的样品为对照, 对照组抑菌活性设为 100%; 抑菌活性采取常规的营养琼脂培养基涂平板法, 将抗菌肽经不同条件处理后的抑菌圈直径除以对照组抑菌圈直径, 计算抑菌效果。

健康成年人血浆由舟山医院-中科院北京基因组研究所提供。将 MDP-1 和 MDP-2 溶于血浆 (浓度为 100 μmol/L), 37℃ 分别孵育 30 min、2 h、4 h、8 h 和 24 h。处理后的样品经 0.22 μm 针头过滤器过滤后进行抑菌活性测试, 指示菌为藤黄叠球菌 *S. luteus*, 抑菌活性测试方法同上。

## 2 结果

### 2.1 厚壳贻贝 Mytilin-1 的结构模拟

图 2 为厚壳贻贝 Mytilin-1 的模拟空间结构, 由图 2 可见, Mytilin-1 采取了典型的二硫键稳定的 α/β 结构, 二硫键连接方式为 CysI-CysV、CysII-CysVI、CysIII-CysVII 和 CysIV-CysVIII; N 端肽段

Cys2-Arg13 形成 α-螺旋, 而肽段 Gly17-Ser22 和 Cys27-Phe32 形成两段 β-折叠, 肽段 Phe23-Arg26 形成连接两段 β-折叠的环状结构(Loop), 碱性氨基酸 Arg25 和 Arg26 突出于环表面。

### 2.2 MDP-1 及 MDP-2 的固相合成及鉴定

合成后的 MDP 粗品经冷冻干燥后呈白色粉末状, 经两步反相高效液相色谱纯化后, 得到单一洗脱峰 (图 3A), 其纯度 > 95%; 质谱检测结果 (图 3B) 表明, 合成后的多肽纯品的单同位素分子量 ([M+H]<sup>+</sup>) 分别为 1197.34 Da (MDP-1) 和 1197.46 Da (MDP-2), 这与 MDP 的理论分子量 (含两对二硫键, 1197.51 Da) 是一致的, 提示合成是成功的, 同时也表明两对二硫键已经正确配对。

对合成过程中 Fmoc 基团的检测表明合成过程中氨基酸的偶联率 > 99%; 合成粗品经复性后的得率为 65%, 经两次分离纯化后, 最终产品得率为 25%。

### 2.3 MDP 的抗菌谱分析

通过倍比稀释法测定了 MDP-1 和 MDP-2 的抗菌活性 (表 1)。分别测得了 MDP-1 和 MDP-2 对于 6 种革兰氏阴性菌、4 种革兰氏阳性菌以及 2 种真菌的 MIC。在所选定的微生物中, MDP-2 在 20 μmol/L 内均有较好的杀灭作用, 尤其对于哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*、溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 以及藤黄叠球菌 *Sarcina luteus* 等。而 MDP-1

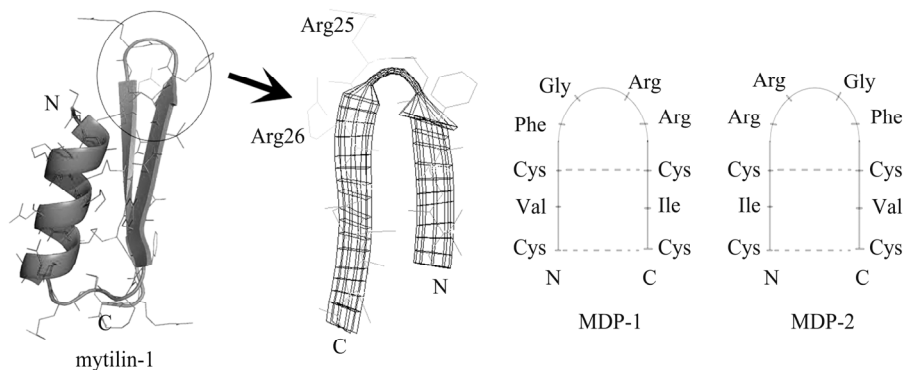


图 2 Mytilin-1 的模拟空间结构、活性区域及 MDP 的设计

Fig. 2 Mimic space structure of Mytilin-1 (using 2EEM as template) from *Mytilus coruscus* and the designation of Mytilin-derived-peptides based on the key region (represented by a circle) of antimicrobial activity. The structure predicted and viewed software were ESyPred3D and Swiss-PdbViewer4.0, respectively. The N- and C-terminal of peptides were labeled by N and C, respectively. The disulfides were labeled by dashed line.

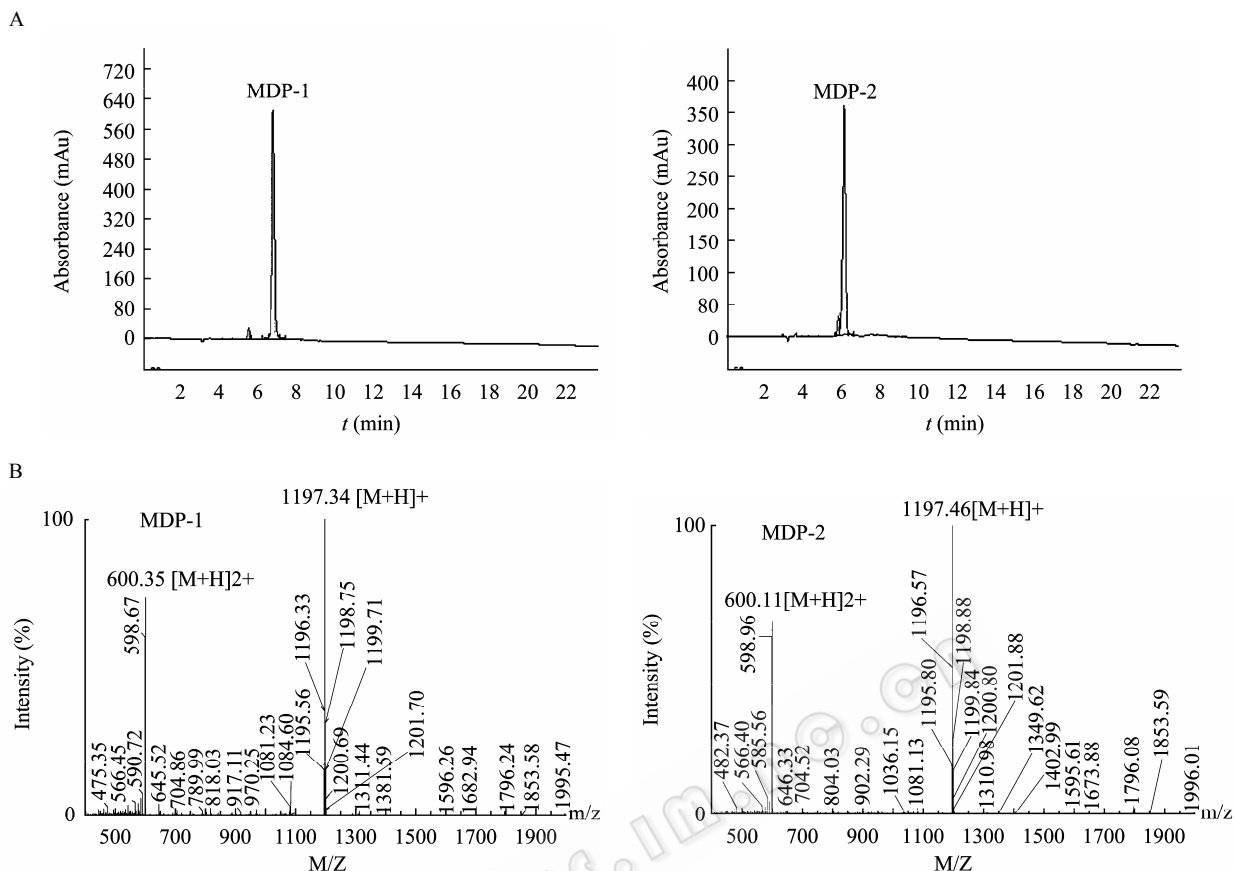


图3 MDP-1及MDP-2合成后的反相高效液相色谱纯化图(A)和质谱鉴定结果(B)

Fig. 3 HPLC isolation (A) and MS analysis (B) of synthesized MDP-1 and MDP-2.

表1 MDP-1和MDP-2对于各种细菌和真菌的最低抑菌浓度(MIC)

Table 1 Activity spectrum of MDP-1 and MDP-2

Organism	MDP-1 ( $\mu\text{mol/L}$ )	MDP-2 ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Bacteria: gram-negative</b>		
<i>Escherichia coli</i>	12.5–25	12.5–25
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	50–100	12.5–25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50–100	12.5–25
<i>Proteus vulgaris</i>	>500	25–50
<i>Vibrio.harveyi</i>	25–50	6.5–12.5
<i>Vibrio alginolyticus</i>	25–50	6.5–12.5
<b>Bacteria: gram-positive</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5–12.5	6.5–12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>500	6.5–12.5
<i>Sarcina luteus</i>	100–200	3.7–6.5
<i>Bacillus megaterium</i>	>500	25–50
<b>Fungus</b>		
<i>Candida albicans</i>	>500	25–50
<i>Monilia albican</i>	>500	25–50

的杀菌作用较弱,除了对大肠杆菌 *Escherichia coli* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 有较好的抑制作用外,对其他微生物的MIC都在20  $\mu\text{mol/L}$ 以上。此外,从表1可以看出MDP-1和MDP-2对于革兰氏阴性菌、阳性菌以及真菌未表现出明显的选择性,说明两者都是广谱抗菌活性。

同时,以藤黄叠球菌为指示菌,对厚壳贻贝天然 Mytilin-1 与人工合成的MDP的抑菌活性进行了比较。结果表明,MDP-2对于藤黄叠球菌的MIC相比Mytilin-1下降了约10倍,而MDP-1对于藤黄叠球菌的MIC相比Mytilin-1下降了约200倍,说明合成的抗菌肽较天然抗菌肽相比,其抑菌活性有所下降。

#### 2.4 MDP的稳定性分析

MDP-1和MDP-2热稳定性较好,其中MDP-1在30 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 和90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热30min后其抑菌活性未见明显下降,而MDP-2经30 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 和

90℃水浴加热 30 min 后, 其抑菌活性也分别下降不到 5%。

MDP 在人血浆中也表现出很强的稳定性, 在人血浆中经 37℃ 孵育 30 min、2 h、4 h、8 h 和 24 h 之后, MDP-1 和 MDP-2 的抑菌活性与未处理样品相比未见明显下降。空白人血浆在本次试验中未观察到抑菌活性。

### 3 讨论

生物抗菌肽具有高效的杀菌作用以及对细菌不容易产生耐受性等优势, 因而在新型生物抗生素的开发中具有重要的研究价值。但相对于传统的有机小分子抗生素, 生物抗菌肽因其属于蛋白质, 其分子量较大, 结构不够稳定且容易被降解, 因而限制了其应用。如何保留生物抗菌肽的抗菌功能, 同时又尽量减小其分子体积并增强其结构稳定性是目前生物抗菌肽开发中的重要内容, 目前这方面已有许多成功的例子<sup>[11-12]</sup>。

贻贝抗菌肽是海洋生物抗菌肽研究中的一个热点, 目前已从贻贝血淋巴中提取到 4 类抗菌肽分子, 分别为 Mytilin、myticin、MGD 和 mytimicin<sup>[1]</sup>。其中, Mytilin 以及 MGD 抗菌肽的空间结构已被解析, 对其结构与抗菌功能关系的研究表明, Mytilin 和 MGD 抗菌肽分子结构中, 连接两段  $\beta$ -折叠的  $\beta$ -发夹结构是其抗菌活性关键区域<sup>[5-6]</sup>。该类型结构域在其他抗菌肽分子也有所发现并已被证明是其发挥抗菌作用的关键区域, 而根据类似的  $\beta$ -发夹结构设计并合成的, 具有抗菌活性的人工抗菌肽也大量报道, 例如 Chiou 等根据抗菌肽 Cecropins 的结构特点合成了一个具有  $\beta$ -发夹结构的 17 肽, 命名为 CF17, 体外实验表明, CF17 具有明显的抗菌及抗病毒活性<sup>[11]</sup>; Tamamura 等<sup>[12]</sup>以及 Shankaram 等<sup>[13]</sup>根据抗菌肽 protegrin 的结构特点设计合成了一种衍生多肽, 为 18 肽, 同样具有  $\beta$ -发夹结构以及体外的抗菌及抗病毒活性。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  $\beta$ -发夹结构的新抗菌肽 iseganan 已被应用于临床三期<sup>[14]</sup>。

贻贝抗菌肽 Mytilin 也具有典型的  $\beta$ -发夹结构, 而天然 Mytilin 分子具有 4 对二硫键, 不论是进行重组表达还是进行固相化学合成, 均面临很大的困难。为进一步验证 Mytilin 抗菌肽的结构与功能的关系, 同时为抗菌肽的人工设计与合成提供新的思路, 本实验对此前从厚壳贻贝血清中提取到的抗菌肽 Mytilin-1 进行了空间结构模拟, 根据其空间结构特点, 对形成连接两段  $\beta$ -折叠的  $\beta$ -发夹结构所包含的肽段进行了重新设计, 在原有 2 个 Cys 的基础上引入 2 个新的 Cys, 通过分步氧化方法促使二硫键的正确配对 (C1-C4, C2-C3), 同时并将肽末端分别乙酰化和酰胺化, 在此基础上合成了两条新的序列相反的 10 肽: MDP-1 和 MDP-2 (图 2)。因 MDP 序列较短, 且只有两对二硫键, 因此其合成产率较高, 最终产品得率为 25%。体外抗菌实验表明, MDP-1 和 MDP-2 均具有广谱抗菌活性, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及真菌均具有杀灭活性, 尤其是 MDP-2 对于部分海洋弧菌类以及人类常见致病菌均有明显的抑制作用。此外, 由于序列较短且有两对二硫键的存在, MDP-1 和 MDP-2 均表现出很强的结构稳定性, 90℃水浴中加热 30 min 后其抑菌活性下降不到 5%; 同时其在人血浆中也表现很好的稳定性, 在血浆中经 37℃孵育 24 h 后其抗菌活性未见明显下降。令人感兴趣的是, MDP-2 的活性要明显强于 MDP-1, 在所测试的大多数菌种中, MDP-2 的抗菌活性要比 MDP-1 高 10~20 倍, 而两者仅仅只是序列相反, 两者间抗菌活性的差异尚有待进一步研究。目前, MDP-1 和 MDP-2 的空间结构仍在解析中。上述研究结果为深入了解具有  $\beta$ -发夹结构的抗菌肽的抗菌机制以及在此基础上开发新型生物抗生素奠定了基础。

### 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**(36): 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 defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J Cell Sci*, 2000, **113**(15): 2759–2769.

[5] Roch P, Yang Y, Toubiana M, *et al*. NMR structure of mussel Mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Dev Comp Immunol*, 2008, **32**(3): 227–238.

[6] Yang YS, Mitta G, Chavanieu A, *et al*. Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry*, 2000, **39**(47): 14436–14447.

[7] Romestand B, Molina F, Richard V, *et al*. Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(13): 2805–2813.

[8] Wang RX, Liu M, Liao Z, *et al*. Purification and identification of Mytilins from *Mytilus coruscus*. *J Fish China*, 2010, **334**(1): 153–159.

王日昕, 刘梅, 廖智, 等. 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的初

步鉴定. *水产学报*, 2010, **334**(1): 153–159.

[9] Lambert C, Leonard N, De Bolle X, *et al*. ESyPred3D: prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 2002, **18**(9): 1250–1256.

[10] Aumelas A, Mangoni M, Roumestand C, *et al*. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem*, 1996, **237**(3): 575–583.

[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 isegagan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy. *Leuk Res*, 2004, **28**(6): 559–565.



**快 讯**

**赖仞组“第三套”抗氧化系统取得新进展**

昆明动物研究所赖仞研究员与上海药物研究所林东海研究员领导的研究团队在多肽研究方面取得了多项成果，继他们在 2009 年首次提出“第三套”抗氧化系统后再度获得新进展，“Frog skins keep redox homeostasis by antioxidant peptides with rapid radical scavenging ability”发表在《Free radical biology & medicine》上。

赖仞等以长日照、强紫外线环境生活的高原蛙类——滇蛙为研究对象，发现滇蛙皮肤具有极强的氧化自由基清除能力，从其皮肤分泌液中发现的由基因编码且可分泌表达的小分子抗氧化多肽为一类新型抗氧化系统，也被称为“第三套抗氧化系统”。以前发现的两大类皮肤抗氧化系统，一类为基因编码的大分子抗氧化酶类，如超氧化物歧化酶(SOD)，另一类为小分子有机物，如一些维生素。

研究者从滇蛙皮肤分泌液中发现了 11 个家族的抗氧化多肽。这些抗氧化多肽是由 15~30 个氨基酸组成的小肽。在体外，它们可以在几秒钟内清除绝大部分氧化自由基，比目前常用的抗氧化添加剂的 BHT (二叔丁基对甲酚) 具有快得多的氧化自由基清除速度。BHT 具有慢性毒性和慢性致癌作用，过量添加会损害人体健康。这些蛙类抗氧化多肽快速、强大的自由基清除能力可以最大限度地保护蛙类皮肤，使其尽可能少地受到日照、紫外线等诱导的自由基损伤。

在该工作基础上，他们对多肽类抗氧化系统对自由基的清除效率、速度以及作用机理进行了深入研究，结果表明抗氧化多肽可以非常快速地清除 80% 以上人造自由基 (小于两秒钟)，其速度是目前商业用抗氧化剂 (如 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚和维生素 E) 的 2~4 倍。抗氧化作用机制研究表明抗氧化多肽序列中的还原性半胱氨酸对快速地清除自由基起着关键作用。

来源: 生物通