

• 生物技术与方法 •

一种猪溶菌酶来源的抗菌六肽的分离鉴定及其性质

朱德伟^{1,2,3}, 蔡国林^{1,2,3}, 陆健^{1,2,3}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

朱德伟, 蔡国林, 陆健. 一种猪溶菌酶来源的抗菌六肽的分离鉴定及其性质. 生物工程学报, 2017, 33(6): 1046–1056.
Zhu DW, Cai GL, Lu J. Purification, identification and characterization of an anti-microbial hexapeptide from *Sus scrofa* lysozyme. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 1046–1056.

摘要: 为提高猪溶菌酶 (*Sus scrofa* lysozyme, SSL) 的抗革兰氏阴性菌活性, 将其进行了不同蛋白酶的水解, 选择抗革兰氏阴性菌效果最好的水解产物, 利用凝胶过滤色谱和反相制备色谱进行分离, 对其功能成分进行液质联用鉴定。对分离得到的物质进行抗菌活性验证和生物信息学的分析, 并在此基础上对抗菌物质的杀菌机理进行了探讨。结果表明, 胰蛋白酶的水解产物具有较高的杀灭革兰氏阴性菌的活性, 进一步分离纯化得到了具有抗革兰氏阴性菌活性的六肽 A-W-V-A-W-K。经化学合成验证, 该六肽既保留了 SSL 的部分抗菌活性, 也具备杀灭多种革兰氏阴性菌的能力。进一步分析发现其位于 SSL 分子 C 端的一个螺旋-回环-螺旋的结构中, 并由此推测其杀菌机理是通过改变细胞膜的渗透性, 进而使细胞内容物流出而造成细胞死亡, 而抗菌实验也验证了这一推测。该抗菌肽的发现为后续提高 SSL 的抗菌活性提供了理论依据。

关键词: 猪溶菌酶, 大肠杆菌, 抗菌肽, 抗生素, 膜渗透性

Received: December 12, 2016; **Accepted:** February 21, 2017

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733602), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51302A), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Jian Lu. Tel/Fax: +86-510-85918191; E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB733602), 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No. JUSRP51302A), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

网络出版时间: 2017-03-31

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170331.1001.001.html>

Purification, identification and characterization of an anti-microbial hexapeptide from *Sus scrofa* lysozyme

Dewei Zhu^{1,2,3}, Guolin Cai^{1,2,3}, and Jian Lu^{1,2,3}

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: *Sus scrofa* lysozyme (SSL) was digested by different proteases to find peptides with enhanced antibacterial activity against gram-negative bacteria. Hydrolysate with the highest anti-bacterial activity was loaded onto a gel filtration chromatography column followed by a reversed-phase one. The obtained substance was identified by liquid chromatography-mass spectrometry, synthesized to test its antibacterial spectrum and analyzed for bioinformatics. The hydrolysate of trypsin showed the highest antibacterial activity. By purification and identification, the functional peptide with sequence of A-W-V-A-W-K was obtained. The peptide was synthesized and proved to retain partial function of SSL and had activity against gram-negative bacteria. By bioinformatics analysis, the peptide was found to locate in a helix-loop-helix structure, suggesting that the peptide may kill cells by penetrating cell membrane and cause the outflow of cell contents. The discovery of the peptide could lay the foundation for improving the antibacterial activity of SSL.

Keywords: *Sus scrofa* lysozyme, *Escherichia coli*, antibacterial peptide, antibiotics, membrane penetrating

由于近年来食品安全事件的频发以及饲用抗生素滥用问题的日益凸显,寻求安全高效的饲用抗生素替代品已经刻不容缓。溶菌酶是一种天然的盐基碱性蛋白质,已经被广泛应用于食品、医药、生物工程以及饲料等领域^[1]。而作为C型溶菌酶的一种,猪溶菌酶(*Sus scrofa* lysozyme, SSL)是猪体内抵抗外源性疾病的一道重要屏障^[2-3]。鉴于猪在畜牧行业中的重要地位,它的发酵生产为解决饲用抗生素的滥用问题提供了选择^[4]。然而,SSL对革兰氏阴性菌的杀菌效果并不明显,这也限制了其应用的范围。因此,提高SSL的抗菌活性,尤其是对革兰氏阴性菌的杀灭作用,对其进一步的生产应用有着重要意义。

目前,提高溶菌酶抗革兰氏阴性菌活性的方法主要包括:热变性^[5-6]、化学修饰^[7-8]、抗菌肽的分离^[9-10]以及融合表达^[11-12]。其中,热变性

的方法可以提高溶菌酶抗革兰氏阴性菌的活性,但是会失去其原有的抗革兰氏阳性菌能力;化学修饰的方法获得的产品其稳定性不能保证,而且生产过程较为繁琐;目前融合表达的方法虽然可获得多功能的产物,但是与SSL分子进行融合的都是外源蛋白,可能会成为动物体内免疫系统或消化酶的作用对象进而影响其在动物体内的作用;抗菌肽的分离虽然暂时将溶菌酶的分子破坏,但是它对进一步提高SSL的抗菌活性具有重要指导价值。比如从SSL分子中分离出对革兰氏阴性菌有抗菌功能的肽段,利用其他分子生物学手段(如融合表达)强化SSL中该抗菌肽的杀菌能力,既可以保持SSL原有的抗菌能力,又能得到性能稳定的发酵产品,是提高SSL抗菌性能的理想途径。

本研究采用多种蛋白酶对SSL进行酶解。在分析其水解产物的抗革兰氏阴性菌活性的基

基础上,利用凝胶过滤色谱、反相制备色谱的分离手段,从水解产物中分离得到 SSL 中对革兰氏阴性菌具有杀菌作用的肽段。对此肽段进行生物信息学的分析以及抗菌特性的研究,为进一步强化该肽段在 SSL 中的作用、增强其抗菌能力提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

SSL 的原核表达菌株 BL21(DE3)-pET28a(+)-SSL,由本实验室构建。SSL 抗菌活性测试菌种大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923、克雷伯氏肺炎菌 *Klebsiella pneumoniae* CMCC(B) 46117、铜绿短杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 以及沙门氏杆菌 *Salmonella enteritidis* CMCC(B) 50335,购自无锡赛维贸易有限公司;溶壁微球菌 *Micrococcus luteus* ATCC 4698,购自南京建成生物科技有限公司;枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Wild Strain, WS)和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (WS) 由本实验室保藏。

1.1.2 试剂与培养基

胃蛋白酶 (Pepsin)、胰蛋白酶 (Trypsin)、梭菌蛋白酶 (Clostripain)、色谱纯甲醇、乙腈,购自 Sigma-Aldrich 公司;凝胶色谱柱 Superdex peptide 10/300GL 购自美国 GE 公司;反相制备色谱柱 XBridge Prep C18 购自美国 Waters 公司。酵母提取物与胰蛋白胨,购自 Oxiod 公司;其他试剂均为分析纯,购自国药集团有限公司。LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5,胰蛋白胨 10, NaCl 10,琼脂 20 (固体培养基),自然 pH, 121 °C

灭菌 20 min。TSB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 15,大豆蛋白胨 5, NaCl 5, pH 为 7.2±0.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器与设备

Dimension® Icon™ 原子力显微镜,美国 Bruker 公司; Spectra Max Plus 384 光吸收酶标仪,美国 Molecular Devices 公司; AKTA™ avant 25 蛋白纯化系统,美国 GE 公司; IKARV10 旋转蒸发仪,德国 IKA 公司; Partec PAS IIIi 流式细胞仪,法国 PARTEC 公司; Scientz-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SSL 的发酵及其复性

SSL 的发酵及其复性参照文献[4]进行。SSL 表达宿主在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L、25 °C、200 r/min 条件下诱导表达 8 h 后,离心弃上清。超声波破碎细胞后,采用氧化还原体系的方法进行复性。复性后经过一步的超滤纯化可得到纯度为 90%以上的 SSL 产品。纯化后的产品经冷冻干燥后于-20 °C 保存备用。

1.2.2 SSL 的蛋白酶水解

分别称取 4 份 1.2.1 中得到的 SSL 产品 70 mg,用 1 mL 0.03 mol/L NaCl 溶液 (pH 7.0) 溶解,前 3 组分别加入 4 mL 的蛋白酶溶液 (50 mg/mL 胃蛋白酶,pH 2.0; 50 mg/mL 胰蛋白酶,pH 10.0; 或 10 U/mL 梭菌蛋白酶, pH 7.5),于 37 °C 条件下过夜酶解。第 4 组试验中,先加入 4 mL 的胃蛋白酶溶液,37 °C 反应过夜之后,调节溶液 pH 至 10.0,加入 200 mg 的胰蛋白酶继续反应 12 h。80 °C 保温 30 min 将酶灭活之后,10 000 ×g 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜之后进行抗菌活性测定,选择抗菌活性最高的水解液进行下一步的分离纯化。其中,每个实验组中的空白

为不加 SSL 的蛋白酶溶液。

1.2.3 抗菌活性测试以及抗菌肽的最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)

水解液的抗菌活性测试参照文献[9]的方法进行。在前期的分离过程中,以大肠杆菌 *E. coli* ATCC 25922 为测试菌进行抗菌活性分析。合成抗菌肽的抗菌谱测定时,对 1.1.1 中涉及的所有测试菌都进行分析。测定时设 3 组平行,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。对实验组与对照组的结果进行 *t* 检验,分析实验结果的差异显著性。

抗菌肽的 MIC 测定参照文献[13]进行。测试抗菌肽的浓度梯度从 1 到 100 $\mu\text{mol/L}$ (250 μL TSB 培养基溶解)。其中不加抗菌肽的测试菌为阳性对照,不加测试菌的抗菌肽溶液为阴性对照, MIC 定义为相对于阳性对照组 OD_{600} 无明显变化的测试组所对应的抗菌肽浓度。测定时设 3 组平行,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。

1.2.4 凝胶过滤色谱分离

抗菌活性分析后选择的水解液,经过 0.22 μm 的滤膜过滤,然后上样至凝胶过滤色谱 Superdex peptide 10/300GL。流速为 0.5 mL/min,流动相为 20 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.0),每 1 mL 的洗脱液收集到一个采样管。用酶标仪对收集的样品进行蛋白浓度 A_{225} 测定,同时进行抗菌活性分析 (用大肠杆菌进行)。

1.2.5 反相制备色谱分离

选择凝胶过滤分离后的样品,用反相制备色谱 Agilent 1100 series 结合色谱柱 Phenomenex luna C18 column (7.8 mm \times 150 mm, 5 μm)。流动相为含 0.1% TFA 的无菌 Milli-Q 水 (A) 和含 0.1% TFA 的乙腈 (B),系统流速为 10 mL/min。梯度洗脱程序为 0–5 min, 5% B; 5–30 min, 5%–50% B; 30–35 min, 50%–80% B。紫外检

测器,检测波长为 225 nm。收集 HPLC 洗脱峰对应的采样管,旋转蒸发之后用 0.03 mol/L NaCl 溶液 (pH 7.0) 补充至采样管中的原体积,并测定其抗菌活性 (用 *E. coli* 进行)。

1.2.6 液质联用 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 鉴定

对反相制备色谱得到的具有抗菌活性的洗脱峰进行 LC-MS 的分析^[14]。LC 条件为色谱柱 Phenomenex luna C18 (4.6 mm \times 250 mm), 乙腈 (3) : 水 (97) : 甲酸 (0.1) 作为流动相 A; 乙腈 (70) : 水 (30) : 甲酸 (0.1) 作为流动相 B。洗脱程序为: 0–10 min, 100% A, 0% B; 20 min, 70% A, 30% B; 30 min, 0% A, 100% B; 35 min 100% A, 0% B; 流速, 1 mL/min; 柱温, 30 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱分析条件为: 毛细管电压, 3.88 kV; 圆锥体电压, 20 V; 离子源温度, 120 $^{\circ}\text{C}$; 去溶温度, 300 $^{\circ}\text{C}$; 流速, 1 mL/min; 分流比, 50 : 1。用 MassLynx 软件 (version 4.1) 对质谱结果进行分析。将软件分析得到的氨基酸序列按照可能性从高到低排序; 同时根据胰蛋白酶的作用位点^[15]列出其水解 SSL 后可能产生的肽段序列。两组序列一一比对,最终确定抗菌肽的氨基酸序列。

1.2.7 生物信息学分析与 Swiss-modelling 建模

经 LC-MS 鉴定后的抗菌肽,提交至抗菌肽数据库 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) 进行比对分析,根据同源或类似序列的分析推测该抗菌肽的生物学特性。抗菌肽的三维结构模拟是借助 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) 在线模拟分析软件进行,选择蛋清溶菌酶作为模板。由于抗菌肽的序列较短,因此选择了包含抗菌肽序列及其上下游共 30 个氨基酸残基进行模拟。

1.2.8 抗菌肽作用后细胞形态的扫描

将 LC-MS 鉴定得到的抗菌肽进行化学合成, 并作用于靶细胞。将抗菌肽处理 ($0.2 \text{ mg}/10^7$ 细胞, 37°C 处理 20 min , 0.1 mol/L 、 $\text{pH } 7.2$ 的 PBS 缓冲液作对照) 过后的微生物 (*E. coli* ATCC 25922 进行, 下同) 离心 ($5\ 000\times g$, 5 min) 收集并洗涤, 按参考文献[16]的方法用玻璃板固定, 然后用原子力显微镜进行观察。

1.2.9 抗菌肽作用后细胞荧光强度的检测

将抗菌肽 (终浓度 1 mg/L) 与靶细胞大肠杆菌 (约 10^8 CFU/mL) 混合后, 于 37°C 条件下培养 30 min , $10\ 000 \times g$ 离心 10 min , 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后的 0.1 mol/L PBS 缓冲液 ($\text{pH } 7.2$) 重悬至原体积, 用超声仪对细胞进行分散。参照 Budde^[17]的方法进行染色, 每毫升的细胞悬浮液中加入 10 mL 的染色液 (10 mmol/L cFDA 染料溶于丙酮中), 37°C 温浴 30 min , 置于避光的冰上保存至流式细胞仪分析。

2 结果与分析

2.1 SSL 的蛋白酶水解物的抗菌活性

图 1 中显示了不同的蛋白酶作用于 SSL 后的水解液的抗菌活性, 其中胃蛋白酶的水解液对革兰氏阴性菌大肠杆菌 *E. coli* ATCC 25922 基本没有杀菌效果, 主要是因为 SSL 对胃蛋白酶的降解作用具有抗性^[18] (SDS-PAGE 结果未显示), 而自然状态下的 SSL 对大肠杆菌并没有明显的杀菌作用。梭菌蛋白酶的水解产物具有一定的抗革兰氏阴性菌能力, 但是效果有限 (抗菌系数为 0.25 , 即杀菌率约为 56%); 而胰蛋白酶对 SSL 的水解物具有最强的抗革兰氏阴性菌活性, 其抗菌系数可达 2.81 (可杀死 99% 以上的靶细胞); 胃蛋白酶结合胰蛋白酶对 SSL 的水解

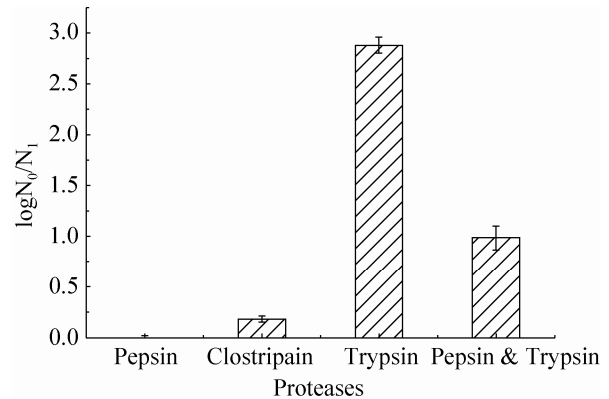


图 1 不同蛋白酶对 SSL 水解产物的抗菌活性
Fig. 1 Anti-bacterial activity of SSL hydrolysates by different proteases.

产物杀菌效果 (抗菌系数为 1.02 , 杀菌率 90%) 要弱于单独使用胰蛋白酶的水解液。一方面胃蛋白酶的存在可能会作为底物竞争性影响胰蛋白酶对 SSL 的降解活性; 另一方面, 胃蛋白酶会使 SSL 水解产物中抗菌活性成分的纯度有所降低, 进而可能影响其杀菌效果。在后续的试验中, 采用胰蛋白酶单独对 SSL 进行水解。然后对其水解产物中的具体抗菌物质进行分离纯化和鉴定。

2.2 SSL 水解物中抗菌肽的分离纯化

2.2.1 凝胶过滤色谱分离

用凝胶过滤色谱 Superdex peptide 10/300GL 对 SSL 的胰蛋白酶水解液进行分离纯化, 洗脱峰如图 2 所示。水解液经过凝胶过滤分离, 得到了 6 个明显的洗脱峰 (编号 I–VI)。分别对其进行抗菌活性分析, 其结果如图中的虚线部分所示。结果表明, 对测试菌大肠杆菌具有抗菌活性的水解片段集中在分子量较小的区间, 其中洗脱峰 V 和 VI 的抗菌活性较高; 而洗脱峰 V 的抗菌系数可达 0.85 , 约是洗脱峰 VI 抗菌活性的 2 倍。因此, 在后续的试验中, 选择洗脱峰 V 的

收集管作为研究对象,进行下一步的反相制备色谱的分离纯化。

2.2.2 反相制备色谱的分离纯化

用反相制备色谱 HPLC 对上一步凝胶过滤色谱中的洗脱峰 V 进行分离纯化,结果如图 3 所示。结果显示,经过反相制备色谱的分离,可得到 7 个明显的洗脱峰 (编号 I-VII),对其洗

脱峰收集液旋转蒸发后冷冻干燥。用同体积的 PBS 溶液 (0.02 mol/L, pH 7.0) 溶解,并进行抗菌活性分析,其结果如图中的虚线部分所示。结果表明,洗脱峰 II 和 III 的抗菌活性较高,其抗菌系数分别为 0.48 和 1.25。在后续的试验中,选择抗菌效果较高的洗脱峰 III 的收集管作为研究对象,进行 LC-MS 鉴定。

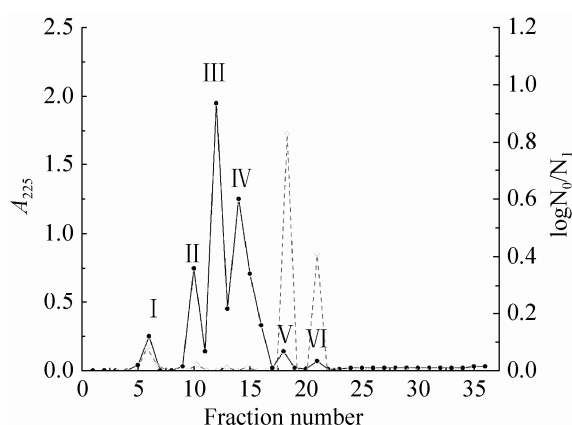


图 2 胰蛋白酶对 SSL 水解产物的凝胶过滤分离
Fig. 2 Gel filtration purification of SSL hydrolysate by trypsin. —: A_{225} ; ···: Anti-bacterial activity.

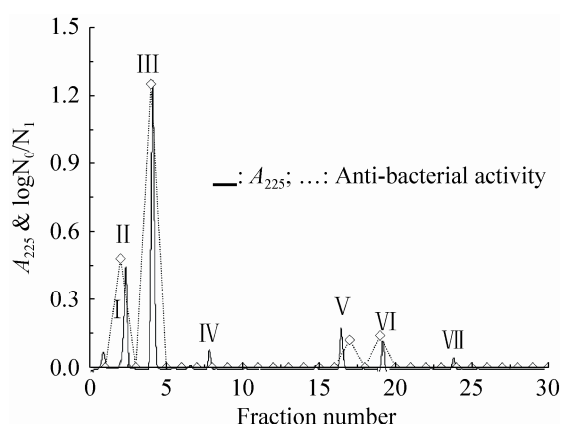


图 3 抗菌物质的反相制备色谱分离
Fig. 3 Reversed phase chromatography of anti-bacterial substrate.

2.3 抗菌物质的鉴定及其生物信息学分析

2.3.1 抗菌物质的 LC-MS 鉴定

对 2.2.2 中反相制备色谱得到的洗脱峰 III 的收集液进行旋转蒸发和冷冻干燥,用无菌水溶解后进行 LC-MS 分析。其 LC 图谱如图 4A 所示,而其质谱鉴定的结果如图 4B 所示,这与文献 [14] 的部分结果一致。经软件 MassLynx (version 4.1) 分析,结合 SSL 的一级结构以及胰蛋白酶的酶切位点,得到了该抗菌肽的氨基酸序列 A-W-V-A-W-K,命名为 SP。此抗菌肽的氨基酸序列分别对应于 SSL 一级结构中的第 108-113 位的氨基酸残基,其分子量为 (759.91±0.5) Da。

2.3.2 抗菌肽的生物信息学分析

将抗菌肽 SP 的氨基酸序列导入抗菌肽数据库进行比对分析,发现其分子的疏水性比率为 83% (疏水性对抗菌肽的抗菌活性有着重要作用),同时其 Boman 系数 (此性质表征抗菌肽与蛋白结合的能力) 为 -1.12 kcal/mol。此外,该抗菌肽属于碱性肽,其等电点 pI 为 9.70。序列比对结果显示,抗菌肽 SP 与来源于 *Xenopus laevis* 的抗菌肽 PGLa-H (AP01814)^[19] 有着 40% 的相似性,后者既能够杀灭革兰氏阳性菌,也能够抗革兰氏阴性菌。为了验证 SP 的抗菌功能与活性,化学合成了此抗菌肽进行后续实验。

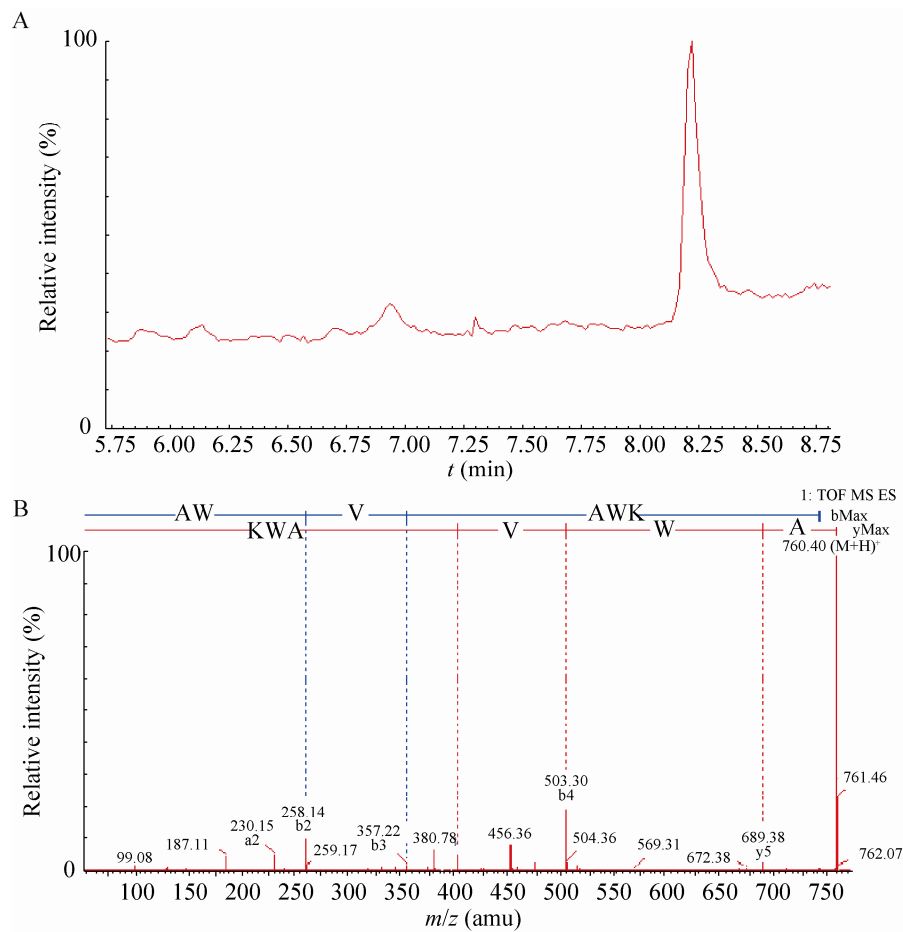


图 4 抗菌肽的 LC-MS 鉴定

Fig. 4 LC-MS identification of anti-bacterial peptide. (A) LC purification. (B) MS identification.

2.4 抗菌肽 SP 的抗菌活性验证

表 1 中列出了纯化得到的抗菌肽 SP 以及合成的 SP 对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性测试菌的抗菌活性及其 MIC。本实验中纯化得到的抗菌肽与化学合成的 SP 抗菌活性类似, 基本可以确认为同一物质。SSL 的抗菌能力主要是针对革兰氏阳性菌; 而抗菌肽 SP 不仅具有抗革兰氏阴性菌的能力, 同时也部分保留了 SSL 的抗革兰氏阳性菌的效果。SP 的抗菌效果与其同源性最高的 PGLa-H (AP01814)^[19] 的抗菌效果较一致, 推测此类抗菌肽的框架 (++A+VA+K++) 可

能是一种对革兰氏阳性菌和阴性菌都有杀菌效果的功能结构域。SSL 与抗菌肽 SP 的抗菌效果的差异主要是由它们的作用机理决定的。SSL 的杀菌机理是由其分子中 E35 的参与下与细胞壁中肽聚糖的糖苷键形成碳正离子中间体, 然后在 D53 的参与下对该中间体进行分离, 进而完成对肽聚糖的水解^[20]。抗菌肽 SP 属于阳离子肽, 而阳离子肽按其二级结构可分为 α 螺旋、拓展结构、Loop 结构以及 β 折叠 4 大类^[21]。为进一步了解 SP 的性质, 有必要对其作用方式进行研究。

表 1 抗菌肽 SP 的抗菌谱检测

Table 1 Antimicrobial activities of peptides obtained in this study

Strain	Antimicrobial activity ^a (logN ₀ /N ₁)			MIC (μmol/L)
	SSL	Purified SP	Synthesized SP	Synthesized SP
<i>Bacillus licheniformis</i> WS (+) ^b	3.31±0.12	3.21±0.18*	3.12±0.15*	5.67±0.44
<i>Bacillus subtilis</i> WS (+)	3.51±0.22	3.20±0.19**	3.03±0.18**	7.33±0.44
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 (+)	2.61±0.18	0.44±0.05**	0.41±0.05**	51.00±0.67
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (+)	0.22±0.03	0.15±0.03**	0.11±0.02**	72.33±0.44
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (-)	0.10±0.02	0.75±0.05**	0.52±0.04**	24.67±0.44
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CMCC (B) 46117 (-)	0	0.61±0.03**	0.52±0.03**	23.00±0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 (-)	0.11±0.02	0.65±0.06**	0.65±0.05**	19.33±0.44
<i>Salmonella enteritidis</i> CMCC (B) 50335 (-)	0	0.09±0.01**	0.10±0.02**	92.00±0.67

^a The peptide or SSL concentrations were 2.5×10^{-7} mol per assay. The assays were performed in triplicate, and *t*-tests were used to compare the differences of peptide to natural SSL; ^b Gram-positive bacteria (+) and gram-negative bacteria (-); **P*<0.05; ***P*<0.01.

2.5 抗菌肽 SP 的作用机理

2.5.1 抗菌肽 SP 在 SSL 中的结构模拟

SP 及其在 SSL 中两端部分序列 (共 30 个氨基酸残基, 对应于 SSL 一级结构的 86-115 位的氨基酸残基的肽段的 3D 结构模拟如图 5 所示。从模拟图可以看出, 该抗菌肽处在一超二级结构模体 Helix-Loop-Helix (HLH) 中的一段螺旋之中 (SP 的位置在 Helix 2 中)。而结构 HLH

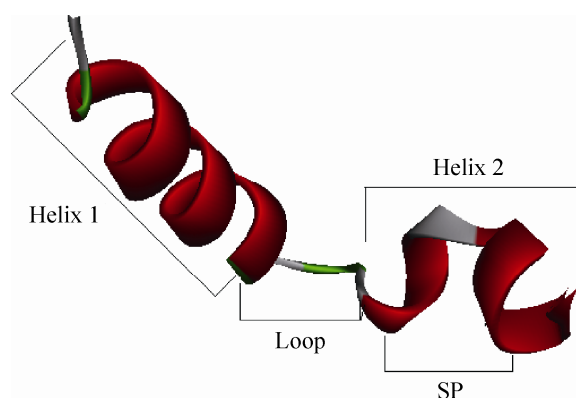


图 5 抗菌肽在 SSL 中的结构模拟

Fig. 5 Structure modelling of anti-bacterial peptide in SSL.

存在于多种抗菌肽中^[22-23], 被证明是与抗菌肽对靶细胞膜的渗透性破坏有关, 其作用方式可以是形成孔洞或者地毯式模型^[24]等。因此, 我们推测, 此种抗菌肽的作用机理也是通过破坏靶细胞膜的渗透性, 从而导致细胞死亡。

2.5.2 抗菌肽 SP 对靶细胞细胞形态的影响

为了进一步验证抗菌肽 SP 的作用方式, 采用原子力显微镜扫描的手段对其作用后的细胞进行检测, 其结果如图 6 所示。从图中可以明显看出, 经过抗菌肽 SP 作用后的靶细胞的细胞完整性遭到了破坏, 细胞大小没有明显变化, 但是部分细胞膜已经破落, 细胞内溶物也有流出。经初步判断, 靶细胞遭到抗菌肽 SP 作用后, 其细胞膜的完整性被破坏, 细胞膜的渗透性也有所改变, 其作用方式与具备 HLH 结构的抗菌肽类似。SP 可通过破坏靶细胞的细胞膜渗透性 (或结构完整性) 进而杀死革兰氏阴性菌, 但是在天然的 SSL 中它们并没有发挥出这种功能。这可能是因为它们都被 SSL 的表面结构所包裹, 并没有足够的机会去接触靶细胞的细胞膜。

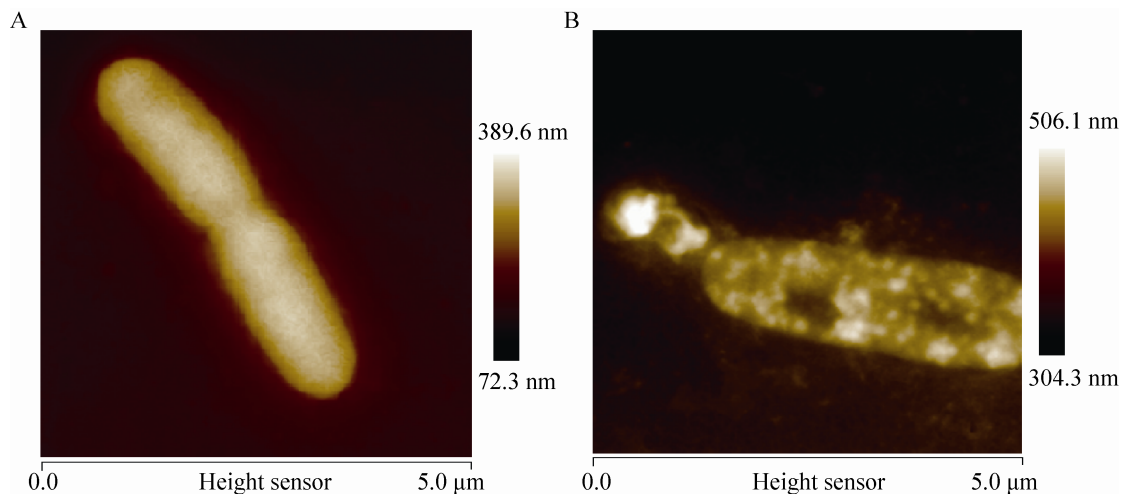


图 6 抗菌肽 SP 作用后的大肠杆菌原子力显微镜扫描图

Fig. 6 Atom force microscopy of *E. coli* cells treated by anti-bacterial peptide. (A) Control cells. (B) SP treated cells.

因此,除了通过改变 SSL 的表面结构,使其疏水性提高,SSL 的作用位点更能够接触其作用底物-肽聚糖层之外;我们提出,利用相应的技术手段,将抗菌肽 SP 暴露在其结构表面,从而直接利用抗菌肽的杀菌作用进行杀菌,是 SSL 增效研究的另一新的途径。

2.5.3 抗菌肽 SP 对靶细胞细胞膜渗透性的影响

图 7 表示了抗菌肽 SP 处理过后的靶细胞 *E. coli* 细胞表面的荧光强度 (FI) 的变化,FI 降低主要是由于细胞外膜的破裂而导致荧光染料外流所致,可用于表征膜电势的变化情况^[25]。结果显示,抗菌肽 SP 作用后的细胞膜表面的平均荧光强度由 253 减少到了 125,降低幅度达 50.6%。说明被 SP 处理过后的细胞膜的结构受到了破坏,导致其通透性得到提高,细胞内溶物流出而导致细胞死亡。Budde 等^[17]在利用细菌素 Bacteriocin 作用于 *Lb. sakei* NCFB 2714 细胞时,得到了类似的结果,其平均荧光强度由 1.55 降至 0.40,降低幅度可达 74%。

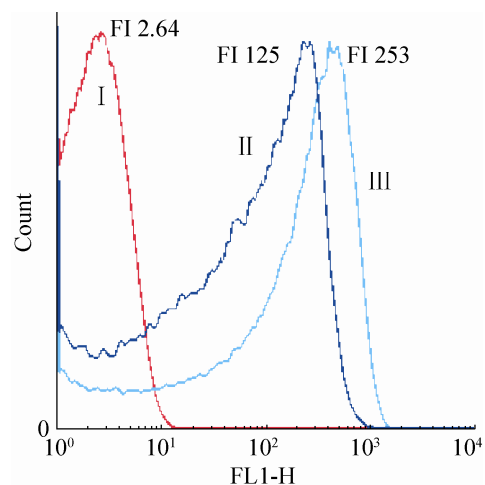


图 7 抗菌肽处理对大肠杆菌细胞膜荧光强度的影响
Fig. 7 Effect of antibacterial peptide on the fluorescence intensity of *E. coli* cell membrane. Line I : PBS buffer; line II : peptide treated *E. coli* cells; line III: control *E. coli* cells.

3 结论

通过对 SSL 进行蛋白酶水解以及抗菌活性分析,发现 SSL 对胃蛋白酶的水解具有抗性,

同时胰蛋白酶的水解物具有最强的抗革兰氏阴性菌活性, 本实验条件下的抗菌系数为 2.81, 可杀灭 99%以上的测试菌。通过凝胶过滤色谱和反相分离色谱的分离纯化, 结合 LC-MS 的分离与鉴定, 得到了一种对革兰氏阴性菌具有抗菌活性的小肽, 其氨基酸序列为 A-W-V-A-W-K (SP)。

经化学合成以后进行抗菌谱的测定, 发现 SP 既可以杀灭革兰氏阴性菌, 也部分保留了 SSL 的抗革兰氏阳性菌的能力。通过 Swiss-modeling 结构模拟、原子力显微镜检测以及细胞膜渗透性实验, 发现 SP 具有 α 螺旋结构, 在 SSL 中位于 N 端的一段 HLH 的超二级结构模体中。

抗菌肽 SP 的发现, 表明 SSL 中存在对革兰氏阴性菌有杀菌作用的片段或结构, 但是由于其分子表面的空间位阻等作用, 导致这些结构的功能没有在自然状态下得以展现。后续研究中, 可以通过改善 SP 等结构周围的环境或者通过基因融合的手段提高 SP 在 SSL 中的比重等方法强化 SP 的杀菌作用, 对提高 SSL 的抗菌谱具有理论指导价值。

REFERENCES

- [1] Zhu D, Cai G, Wu D, et al. Comparison of two codon optimization strategies enhancing recombinant *Sus scrofa* lysozyme production in *Pichia pastoris*. *Cell Mol Biol*, 2015, 61(2): 43–49.
- [2] Yu M, Irwin DM. Evolution of stomach lysozyme: the pig lysozyme gene. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 5(2): 298–308.
- [3] Palmieri C, Brunetti M, Salda LD. Immunohistochemical characterization of Kisselev nodules (ectopic lymphoid follicles) in wild boar (*Sus scrofa* L.). *Res Vet Sci*, 2007, 83(1): 109–115.
- [4] Zhu DW, Cai GL, Lu J. The expression of *Sus scrofa* lysozyme in *E. coli* and its refolding. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(10): 23–28 (in Chinese).
朱德伟, 蔡国林, 陆健. 猪溶菌酶在大肠杆菌中的表达及其复性. *食品与发酵工业*, 2016, 42(10): 23–28.
- [5] Derde M, Guérin-Dubiard C, Lechevalier V, et al. Dry-heating of lysozyme increases its activity against *Escherichia coli* membranes. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(7): 1692–1700.
- [6] Cong L, Yang X, Wang X, et al. Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(6): 583–588.
- [7] Liu ST, Sugimoto T, Azakami H, et al. Lipophilization of lysozyme by short and middle chain fatty acids. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(2): 265–269.
- [8] Ibrahim HR, Taniyama N, Aoki T. Distinct dimerization between α -lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Lett Drug Des Discov*, 2004, 1(2): 101–109.
- [9] Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, et al. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J Appl Microbiol*, 1997, 82(3): 372–378.
- [10] Mine Y, Ma FP, Lauriau S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(5): 1088–1094.
- [11] Lu XM, Jin XB, Zhu JY, et al. Expression of the antimicrobial peptide cecropin fused with human lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(6): 2169–2176.
- [12] Zhao H, Tang J, Cao L, et al. Characterization of bioactive recombinant antimicrobial peptide parasin I fused with human lysozyme expressed in the yeast *Pichia pastoris* system. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 77(3): 61–67.
- [13] Wang AP, Su YP, Wang S, et al. Antibacterial activity and mechanism of recombinant human

- α -defensin 5 against clinical antibiotic-resistant strains. *Afr J Microbiol Res*, 2010, 4(8): 626–633.
- [14] Zhu D, Cai G, Li X, et al. Enhancing the antimicrobial activity of *Sus scrofa* lysozyme by N-terminal fusion of a sextuple unique homologous peptide. *J Biotechnol*, 2017, 243: 61–68.
- [15] Rawling ND, Barrett AJ. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*, 1994, 244: 19–61.
- [16] Soon RL, Nation RL, Harper M, et al. Effect of colistin exposure and growth phase on the surface properties of live *Acinetobacter baumannii* cells examined by atomic force microscopy. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 38(6): 493–501.
- [17] Budde BB, Rasch M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Int J Food Microbiol*, 2000, 63(1/2): 65–72.
- [18] Nonaka Y, Akieda D, Aizawa T, et al. X-ray crystallography and structural stability of digestive lysozyme from cow stomach. *FEBS J*, 2009, 276(8): 2192–2200.
- [19] Hou F, Li J, Pan P, et al. Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 38(6): 510–515.
- [20] Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, et al. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 2001, 412(6849): 835–838.
- [21] Wu M, Maier E, Benz R, et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1999, 38(22): 7235–7242.
- [22] Engelman DM, Steitz TA. The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell*, 1981, 23(2): 411–422.
- [23] Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43767–43774.
- [24] Strömstedt AA, Ringstad L, Schmidtchen A, et al. Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2010, 15(6): 467–478.
- [25] Chikindas ML, Garcia-Garcerá MJ, Driessen AJ, et al. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(11): 3577–3584.

(本文责编 陈宏宇)