

抗菌肽 CM4 对酿酒酵母原生质体再生抑制作用的研究*

徐进署 张双全 闫晓梅 刘平 刘楠**

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 抗菌肽 CM4 能抑制酿酒酵母原生质体的再生, 随着加入抗菌肽浓度的增大, 原生质体的再生率下降。用荧光素 FITC 标记的抗菌肽处理原生质体, 激光共聚焦扫描电镜观察, 抗菌肽分子覆盖于膜, 破坏了原生质体的膜结构, 改变了原生质体的膜渗透性。最终原生质体无法恢复细胞壁而死亡。

关键词: 抗菌肽 CM4, 酿酒酵母原生质体, 再生率, 激光共聚焦扫描分析

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 03-0056-04

THE ANTIBACTERIAL PEPTIDE CM4 INHIBITS REGENERATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROTOPLAST BY DAMAGING ON THE PLASMA MEMBRANES

XU Jin-Shu ZHANG Shuang-Quan YAN Xiao-Mei LIU Ping LIU Nan

(School of life science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: The antibacterial peptide CM4 having potent antifungal activity on inhibiting the cell wall regeneration of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. When the peptide increased, the ratio of the regenerated colonies drop obviously. To study the antifungal mechanism of the antibacterial peptide, fluorescence-labeled peptide mixed with the protoplast of yeast, then confocal laser scanning microscopy were performed. The results indicated that the peptides interacted with the protoplast membrane and damaged the structure of the membrane, then the permeation of protoplast changed. Finally the protoplasts with the peptide failed to regenerate the cell walls leading to killing the cell.

Key words: Antibacterial peptide CM4, *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts, Ratio of regeneration, Confocal laser scanning microscopy

抗菌肽是由生物体产生的具有抗菌作用的小分子蛋白质, 能杀死细菌、真菌、原虫, 而且还能抑制病毒的繁殖。抗菌肽的家族庞大, 种类繁多。最早的抗菌肽是从昆虫体内分离纯化的, 属于 Cecropins 家族, 它们结构上具有一个显著的特点, 即形成两亲性的 α -螺旋结构区域。许多研究发现 α -螺旋结构在它的抗菌活动中起着关键性的作用。正是这种结构使其靠静电作用结合于膜表面, 然后插入膜结构中形成渗透性的膜离子通道, 或直接导致膜产生孔洞, 细胞的内容物外流, 最后细胞死亡。

家蚕抗菌肽 CM4 也属 Cecropins 家族, 与 Cecropins 家族的成员相似, 它也有两亲性的 α -螺旋结构区域。家蚕抗菌肽 CM4 具有膜破坏性的功能, 过去的研究主要集中在抗

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3970117)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 3970117)

** 通讯联系人

收稿日期: 2000-01-14, 修回日期: 2001-01-21

细菌等原核生物方面,后来张双全等^[1]发现抗菌肽也能破坏癌细胞,抗菌肽分子毁坏细胞膜使其成为碎片,细胞裂解而死亡。除此以外,抗菌肽也可能进入细胞内部阻碍正常的代谢进行,比如抗菌肽能破坏真核细胞骨架的完整性^[2]。王芳等^[3]发现,抗菌肽还能导致染色体的断裂。酿酒酵母是一种典型的真核细胞,我们用它作为抗菌肽对真菌的抗性研究对象,目的在于探讨抗菌肽作用机制的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由南京师范大学生命科学学院微生物研究室保存赠用。

1.1.2 试剂:抗菌肽 CM4 为本实验室制备保存。Yeast extract 为 ALDRICH 产品;纤维素酶为上海丽珠东风生物技术有限公司产品;蜗牛酶与其它试剂除注明外均为国产分析纯。

PBS: 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (PB), 含 0.8mol/L 山梨醇, pH5.8。0.85% NaCl 生理盐水。

YEPD (培养酵母菌用): 1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖, 1.2% 琼脂粉。

YEPDS (培养酵母原生质体用): 在 YEPD 基础上, 加山梨醇, 浓度为 0.8mol/L。

1.1.3 仪器: Allegra™21R 型离心机为 Beckman 公司产品; MRC-1024ES 型激光共聚焦扫描系统为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽的荧光标记及其纯化鉴定: 基本参照文献 [4] 的方法进行, 稍作修改。

1.2.2 酿酒酵母原生质体的制备: 参照《微生物遗传学实验技术》中的方法^[5], 稍作修改。取生长对数期酿酒酵母悬液 5mL, 3500r/min, 离心 5min; 用 PB 液洗 2 次, 相同条件下离心; 弃上清, 加 5mL 0.1% 的 β -巯基乙醇-PB 液, 28℃ 下保温 10min, 再离心, 3500r/min, 4min; 弃上清, 加 5mL 1% 蜗牛酶-PBS 液, 28℃ 下, 150r/min 水浴振荡保温 40~60min; 用 PBS 洗两次, 然后加 5mL PBS 液, 放 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 抗菌肽对酿酒酵母原生质体再生的影响: (1) 取酵母菌原生质溶液 0.5mL, 用 0.85% NaCl 生理盐水稀释 100 倍。取稀释的原生质体 0.1mL 于 YEPD 平板中加少量 NaCl 生理盐水平铺涂匀, 重复 3 个平板, 28℃ 下培养 3d 计数, 此为酶处理后的未脱壁的细胞数 (B)。另取适当稀释的原生质体 0.1mL 于另外 10 个 YEPDS 平板中, 依次加 0 (2 次)、10 μ L、20 μ L、40 μ L、60 μ L、80 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L 抗菌肽溶液 (浓度为 2.1 μ g/mL) 于各个平板中, 用 NaCl 生理盐水涂匀。置 28℃ 下培养, 计数。为酶处理后的未脱壁的细胞数和原生质体再生的细胞数的总和 (C)。

(2) 酵母菌原液作相同处理。取稀释 100 倍酵母菌原液 0.1mL 分别与 10 μ L、20 μ L、40 μ L、60 μ L、80 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L 抗菌肽混匀, 涂匀 YEPD 平板, 置 28℃ 下培养。3d 后统计菌落克隆数, 此为酶处理前的细胞数 (A)。

(3) 按下列公式计算原生质体形成率和原生质体再生率^[4]: 原生质体形成率 (%) = (A-B) / A; 原生质体再生率 (%) = (C-B) / (A-B)。

A 为酶处理前的细胞数; B 为酶处理后的未脱壁的细胞数; C 为酶处理后的未脱壁

的细胞数和原生质体再生的细胞数的总和。

1.2.4 抗菌肽 CM4 对酵母原生质体作用的激光共聚焦扫描图象分析：包裹有多聚赖氨酸的载玻片，浸在酵母原生质体悬液中，加适量标记荧光素的抗菌肽于悬液中，0.5h 后，置于激光共聚焦扫描显微镜下观察原生质体的变化，激光发光波长 488nm，发射波长 495nm。

2 结果

2.1 抗菌肽 CM4 对酵母原生质体再生率的影响

由于酵母的细胞壁已经去掉，细胞膜裸露出来，具有两亲性的 α -螺旋结构的抗菌肽分子结合与膜，造成膜渗透性的破坏，而无法恢复细胞壁，最终死亡，随着抗菌肽量的增多，酵母原生质体的破坏数量也增大，原生质体的再生率降低（图 1）。

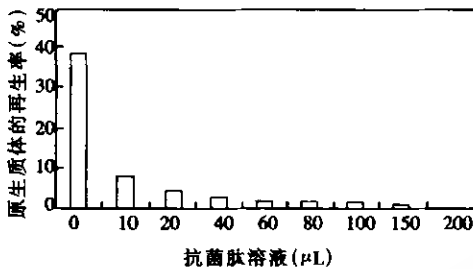


图 1 抗菌肽 CM4 对酿酒酵母原生质体再生的影响

2.2 抗菌肽作用于酵母原生质体的激光共聚焦扫描显微镜观察

图 2 显示，抗菌肽破坏原生质体首要的位点是作用于膜。激光共聚焦扫描观察发现荧光标记抗菌肽迅速包围酿酒酵母原生质体，结合于膜上。该文共选择了 3 个样品的实验结果，A-J、K-O、P-Q 分别代表不同样品的激光共聚焦观察过程。图 2 中 A-J 表示原生质体在抗菌肽作用下由完整到破裂消散的过程。K-O 表示了另一个样品的观察过程，抗菌肽刚刚作用于原生质体膜时，它的形状完好，轮廓清晰（如图 2K），逐渐破裂，最后形成一堆细胞碎片（如图 2O）。图 2P 和 Q 表示抗菌肽破坏原生质体膜，造成断裂的结果。这些结果表明抗菌肽首先插入原生质体膜，随着作用时间的延长，膜被破坏，细胞破碎变形而死亡。

3 讨论

昆虫的抗菌多肽能杀死大多数的有害细菌、某些原生动物、真菌和癌变的细胞，主要作用方式是破坏细胞膜的结构。由于大多数抗菌肽都具有一端亲水，一端疏水的两亲性结构区域，它的疏水端很容易插入质膜内，与膜脂相互作用而形成孔洞，导致细胞内容物外泄，以致细胞死亡^[6]。傅南雁^[7]等认为抗菌肽与脂多糖分子结合并破坏外膜结构，改变膜的通透性，引起呼吸作用下降和新陈代谢丧失，从而影响大分子的生物合成，导致细胞衰亡。可见，抗菌肽首要的作用靶点是细胞膜。

实验发现抗菌肽 CM4 能抑制酿酒酵母原生质体的再生。如图 1 所示，随着抗菌肽量的加大，原生质体的再生率逐渐减小，显然抗菌肽破坏了原生质体的活性。而用抗菌肽直接作用于酿酒酵母细胞，发现酿酒酵母生长很少受抗菌肽的影响。它们的不同在于后者有细胞壁结构，细胞壁妨碍了抗菌肽与胞膜的作用。Lee 等^[8]设计的实验也正说明这个问题，他们用人工合成的抗菌肽处理真菌原生质体，发现不但真菌细胞壁无法恢复，而且细胞也被破坏，无法保持正常的细胞形态。认为抗菌肽对细胞质膜起作

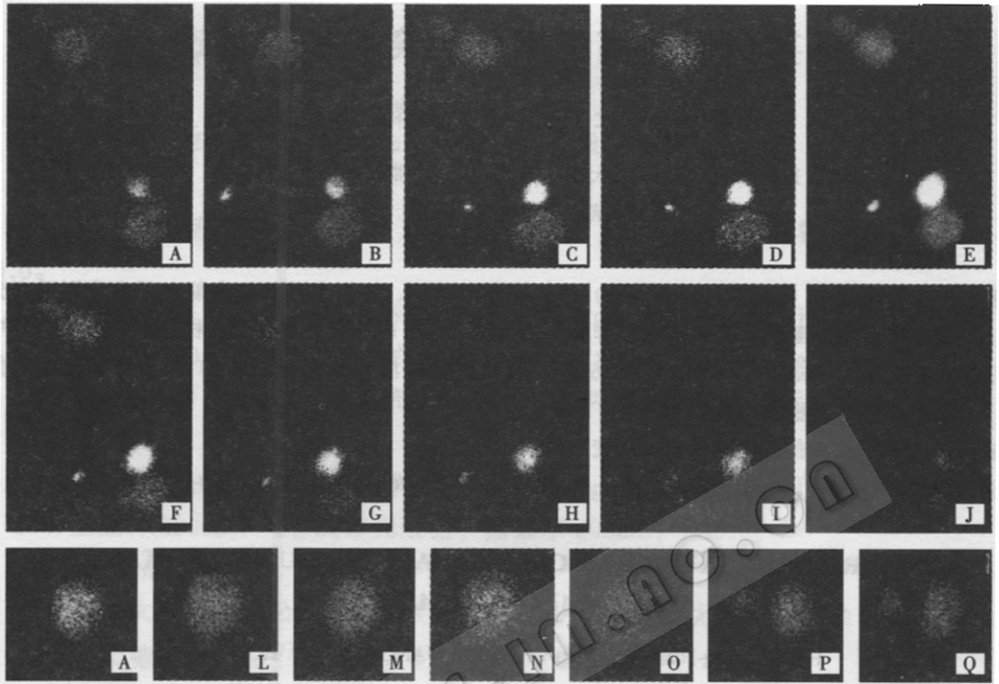


图 2 抗菌肽 CM4 作用于酿酒酵母原生质体的激光共聚焦扫描观察结果

A-J 原生质体在抗菌肽作用下由完整形态到破裂消散的过程,

K-O 表示另一个样品遭抗菌肽毁坏的过程,

P-Q 抗菌肽使原生质体出现断裂,裂痕加大

用,使膜上形成孔洞而达到杀菌目的。我们用 FITC 荧光标记抗菌肽处理原生质体后,进行激光共聚焦扫描发现酿酒酵母的原生质体表面积聚大量的抗菌肽,包围原生质体,说明抗菌肽首攻的靶位点是原生质体的膜。在很短的时间内造成胞膜凹陷,穿洞,大量内容物外流,形成许多空泡,以致崩解(图 2)。可见抗菌肽对原生质体的作用也是首先作用于质膜。

参 考 文 献

- [1] 张双全, 贾红武, 戴祝英. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24 (2): 159 ~ 163.
- [2] 赵东红, 张双全, 戴祝英, 等. 高技术通讯, 2000, 1: 23 ~ 27.
- [3] 王 芳, 张双全, 戴祝英. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (1): 64 ~ 67.
- [4] Park C B, Kim H-S and Kim S-C. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1998, 244 (1): 253 ~ 257.
- [5] 贾盘兴, 蔡金科主编. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992, 260 ~ 261.
- [6] Boman H G. Cell, 1991, 65: 205 ~ 207.
- [7] 傅南雁, 许家喜. 生命的化学, 1998, 18 (2): 25 ~ 28.
- [8] Lee D G, Sin S Y, Maeng C-Y, et al. Biotechnology Letter, 1998, 20 (3): 211 ~ 214.