

鲎素的抗菌靶点初探*

代建国^{1)**} 谢海伟^{1,2)**} 金 刚^{1)***} 张 燕¹⁾ 朱俊晨¹⁾ 郭 勇²⁾

¹⁾深圳职业技术学院化生学院, 深圳 518055; ²⁾华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640

摘要 采用体外抑菌法测定鲎素的抑菌动力学特点, 钼酸铵比色法和紫外吸收法分别检测细菌与鲎素共同孵育前后无机磷和大分子泄漏情况, 扫描电镜和透射电镜观察细菌与鲎素共同孵育前后细菌形态和结构的变化, 紫外吸收法和凝胶电泳法分别观察鲎素对细菌基因组 DNA 和质粒 DNA 结构的影响, 质粒转化实验检测鲎素对质粒 DNA 复制和转录功能的影响. 结果表明, 鲎素对革兰氏阳性菌和阴性菌具有不同的抑菌动力学特点, 经鲎素处理的细菌, 胞内无机磷和大分子泄漏显著, 细胞壁膜和菌体遭到不同程度的破坏, 鲎素可与细菌基因组 DNA 和质粒 DNA 结合, 高浓度鲎素有可能使 DNA 发生断裂, 从而使质粒 DNA 复制和转录功能受到抑制. 上述结果提示, 鲎素的抗菌靶点至少包括细胞壁膜和菌体 DNA.

关键词 鲎素, 抗菌靶点, 细胞壁, 细胞膜, DNA

学科分类号 R9, Q93

自 Boman 等^[1]首次从惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)中分离出抗菌肽以来, 有关抗菌肽化学结构、生物活性、抗菌机理、抗菌效果及其应用迅速成为研究热点. 目前全世界已发现的各种来源的抗菌肽近千种, 其中许多抗菌肽具有较好的抗菌效果, 但由于许多抗菌肽的抗菌靶点还不是很清楚, 导致抗菌机理研究无法深入开展. 一般认为, 抗菌肽的杀菌过程主要分为吸附结合阶段、穿膜阶段^[2], 以及对细胞质或核物质的损伤阶段^[3], 其中后两个阶段还有诸多细节尚未阐明.

鲎素最初由 Nakamuro 等^[4]从中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)血细胞分离纯化制得, 由 17 个氨基酸构成, 相对分子质量为 2 263, 等电点(pI)为 12.3, 含有 2 个二硫键, 二级结构呈典型的反平行 β 折叠结构, 具有抗细菌^[5]、抗真菌^[6]、抗病毒^[7]、抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化^[8]的生物活性, 具有巨大的潜在应用价值. 但迄今为止, 鲎素抗菌动力学特点尚未见报道, 其抗菌机制尚不十分清楚. 本文通过研究鲎素抗菌活力随时间变化关系, 鲎素对膜通透性、细菌超微结构及 DNA 结构等影响, 初步探索鲎素的抗菌靶点. 该研究结果为系统揭示鲎素杀菌的分子机制提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 鲎素分离纯化及受试菌株

中国鲎(20 只, 壳宽 20~40 cm, 体重 1.5~

5.0 kg, 雌雄各半)购于深圳南澳海鲜市场, 饲养于深圳职业技术学院化生学院实验室, 按照文献[4]所述方法并稍做改动, 将分子筛填料换成 Superdex 30 prep grade(Amersham Biosciences), 离子交换剂换成 DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences)分离纯化制备鲎素, 经冷冻干燥得到固体粉末, -20℃ 保存备用. HPLC 法表明提取鲎素和人工合成鲎素标准品保留时间一致. 实验用枯草杆菌 WB800(*Bacillus subtilis* WB800)由加拿大 Calgary 大学 Wong Sui-Lam 教授惠赠, 大肠杆菌 K88(*Escherichia coli* K88)、大肠杆菌 F41(*Escherichia coli* F41)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及大肠杆菌 Top10 购自中国兽医药品监察所, 深圳职业技术学院化生学院实验室保存备用.

1.2 鲎素抑菌动力学特点研究

分别取对数生长期大肠杆菌 K88、大肠杆菌 F41、枯草杆菌 WB800 及金黄色葡萄球菌, 用液体培养基稀释菌液至 10^6 CFU/ml ($A_{630} = 0.01 \sim 0.02$) 作为测试菌液. 将鲎素加入到 96 孔细胞培养板中, 每孔 50 μ l, 然后加入 10^6 CFU/ml 的菌液 100 μ l,

* 广东省自然科学基金项目(05300281, 04011209)和深圳市科技计划(05KJBB003)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0755-26019267, E-mail: jingang@oa.szpt.net

收稿日期: 2007-10-15, 接受日期: 2007-12-13

使鲎素终浓度为 40 mg/L, 37℃, 150 r/min 摇床培养, 每隔 3 h 取样用自动酶标仪在波长为 630 nm 检测吸光度 A . 对照组为 150 μ l 菌液(未加鲎素). 按 Hultmark 等^[9]的方法计算抗菌活力: $U = \sqrt{(A_0 - A) / A_0}$ (A_0 为对照组的吸光度).

1.3 磷泄漏检测

参照陈念等^[10]方法将对数生长期的金黄色葡萄球菌离心, 收集菌体, 用 pH 7.0, 5 mmol/L HEPES-Na 缓冲液(含 1% NaCl)重悬浮菌体, 然后依次向 10 ml 离心管中加入 HEPES-Na 缓冲液、菌液和鲎素, 使菌液最终浓度为 2.0×10^7 CFU/ml, 鲎素浓度为 40 mg/L, 以灭菌超纯水代替鲎素作对照. 在不同时间下室温孵育, 离心收集上清, 分别测定上清中磷含量. 采用钼酸铵比色法测定磷含量, 步骤如下: 吸取测定样品 2 ml 及其空白溶液, 分别置于 20 ml 具塞试管中, 依次加入 2 ml 钼酸铵溶液, 静置数秒, 加入 1 ml 20%亚硫酸钠、1 ml 对苯二酚溶液, 摇匀, 加水至刻度, 静置 0.5 h, 分光光度计 660 nm 处测吸光度.

1.4 紫外吸收物质泄漏检测

取对数生长期大肠杆菌 K88, 用 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液稀释为 1×10^6 CFU/ml. 实验组分为两组: 一组用浓度为 5、20、40 mg/L 的鲎素分别与稀释菌液于 37℃ 共同孵育 3、6、9、12、15、18、24 h, 以未加鲎素稀释菌液为对照; 另一组菌液中未加鲎素, 而在每次取样的同时加入 2 g/L 的 TritonX-100 处理 1 h, 使菌体死亡破裂, 胞内物质完全泄漏. 测定样品分别经 0.22 μ m 滤膜过滤, 滤液于紫外分光光度计 260 nm 波长测定其吸光值, 并计算胞内紫外吸收物质渗透率 = $A/A_1 \times 100$, A 为菌液中加入鲎素后的吸光度或未加鲎素的吸光度, A_1 为菌液中加入 TritonX-100 处理后的吸光度.

1.5 扫描电镜观察

分别取对数生长期的大肠杆菌 F41 和金黄色葡萄球菌, 用新鲜培养基稀释成 10^6 CFU/ml 的细菌悬液. 取适量鲎素加入到 5 ml 细菌悬液中, 使鲎素终浓度达到 40 mg/L, 对照组添加无菌水, 37℃ 下振荡培养 3 h, 低温离心弃上清, 用无菌水漂洗 2 次, 3%戊二醛-多聚甲醛固定液固定 2~4 h, pH 7.2 磷酸缓冲液漂洗数次, 再用 1%锇酸固定 1.5 h 后, pH 7.2 磷酸缓冲液漂洗数次, 用 50%、70%、90%和 100%的乙醇脱水, 再用乙醇: 戊二醇(先 1:2, 后 2:1)依次漂洗, 喷于铜网上烘

干. 扫描电镜观察、记录结果并拍照.

1.6 透射电镜观察

菌液处理同 1.5. 收集处理后的菌体, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液漂洗两次, 加入 4%戊二醛, 4℃固定过夜, 离心收集菌体, 加 1.5%的琼脂糖对菌体进行包埋. 待凝固后, 用刀片将样品切成长条状, 重新放入固定液. 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤样品 6 次, 每次 10 min, 用 50%、70%、80%、90%和 100%乙醇脱水, 再用环氧丙烷、环氧丙烷+硫酸铜分别处理 10 min, 然后分别用 3:1、1:1 和 1:3 比例的环氧丙烷: 环氧树脂处理 30 min, 环氧树脂保存过夜, 最后用 Epon818 树脂包埋、超薄切片和染色. 透射电镜观察、记录结果并拍照.

1.7 鲎素对细菌基因组 DNA 增色效应的观察

利用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取大肠杆菌 F41 基因组 DNA, 在 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)介质中, DNA 与 40 mg/L 鲎素水溶液于 37℃ 避光孵育 3、6、12 和 18 h 后, 分别测其波长在 220~320 nm 范围内的紫外吸光光谱^[11].

1.8 鲎素对细菌质粒 DNA 凝胶迁移的影响

配制不同浓度鲎素溶液, 取不同浓度的鲎素和高拷贝数质粒 PUC-18 各 5 μ l 混合均匀, 使鲎素的最终浓度分别为 640、320、160、80、40、20、10、50 和 2.5 mg/L. 以无菌水空白为对照, 于室温避光孵育 1 h, 进行 0.8%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统观察拍照.

1.9 鲎素对细菌质粒 DNA 复制转录的影响

将 1.8 处理的质粒样分别转化大肠杆菌 Top10, 挑取阳性克隆培养, 提取质粒, 分析质粒浓度和纯度.

2 结 果

2.1 鲎素抑菌动力学特点

鲎素抑菌动力学特点见图 1.0~10 h 时, 鲎素对大肠杆菌 K88 和 F41 的抑菌活力呈对数增长式, 10 h 达到最高, 10~30 h 处于稳定期, 30 h 时开始下降; 鲎素对枯草杆菌 WB800 和金黄色葡萄球菌的抗菌活力在 0~3 h 之间呈对数增长式, 3 h 时出现一个峰值, 3~10 h 稍微下降, 10~14 h 又以对数增长式达到最高, 14 h 后抑菌动力学规律和大肠杆菌 K88 和 F41 相似.

2.2 鲎素对细菌细胞膜通透性的影响

鲎素对金黄色葡萄球菌磷泄漏水平的影响见

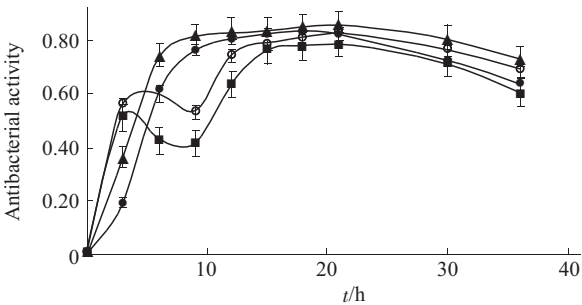


Fig. 1 Antibacterial dynamics of tachyplesin for different bacterium
●—●: *E. coli* K88; ▲—▲: *E. coli* F41; ■—■: *B. subtilis* WB800; ○—○: *S. aureus*.

图 2. 经鲎素处理, 金黄色葡萄球菌磷泄漏明显高于对照组, 且在 0~3 h 内变化明显, 3~10 h 缓慢下降, 10 h 后开始缓慢回升达到稳定水平.

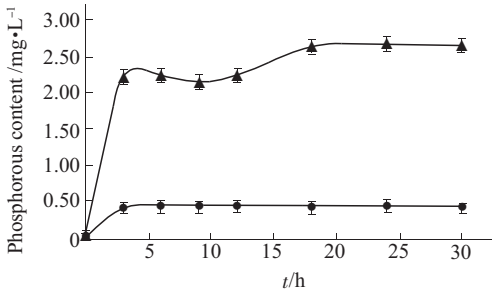


Fig. 2 Phosphorous leakage of *S. aureus* treated with and without tachyplesin at different time
●—●: Without tachyplesin(control); ▲—▲: With tachyplesin.

鲎素对大肠杆菌 K88 胞内紫外吸收物质泄漏的影响见图 3. 未加鲎素时, K88 胞内紫外吸收物质不泄漏; 当鲎素作用浓度为 5 mg/L 时, K88 胞

内紫外吸收物质开始泄漏, 但数量很少, 随时间延长, 泄漏量基本不变; 当鲎素浓度为 20 mg/L 和 40 mg/L 时, 泄漏随时间延长而呈规律性变化, 0~10 h 之间, 泄漏缓慢上升, 超过 10 h 后, 泄漏随时间延长显著增高.

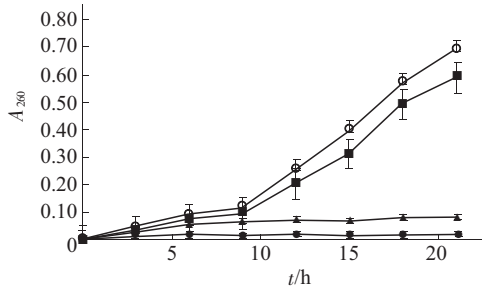


Fig. 3 Permeability of UV absorbing substance in *E. coli* K88 treated with and without tachyplesin at different concentration
●—●: Without tachyplesin (control); ▲—▲: With 5 mg/L tachyplesin; ■—■: With 20 mg/L tachyplesin; ○—○: With 40 mg/L tachyplesin.

2.3 鲎素对细菌超微结构的影响

扫描电镜观察显示, 鲎素作用于 F41 后, 大部分菌体变得不完整, 胞浆外泄, 菌群粘连, 说明细胞壁膜和胞内结构遭到比较大的破坏(图 4a), 而对照组细胞形态规整, 壁膜完整, 无粘连成堆现象, 细胞质浆无外泄(图 4b). 透射电镜观察表明, 鲎素作用 F41 后, 细胞表面明显变粗糙, 细胞壁膜遭到不同程度的裂解, 出现较多丝状突起, 胞浆外泄, 胞质出现空化趋势(图 4c), 而对照组 F41 细胞结构完整, 细胞外观平滑, 壁膜完整, 细胞饱满, 细胞内容物致密充实(图 4d).

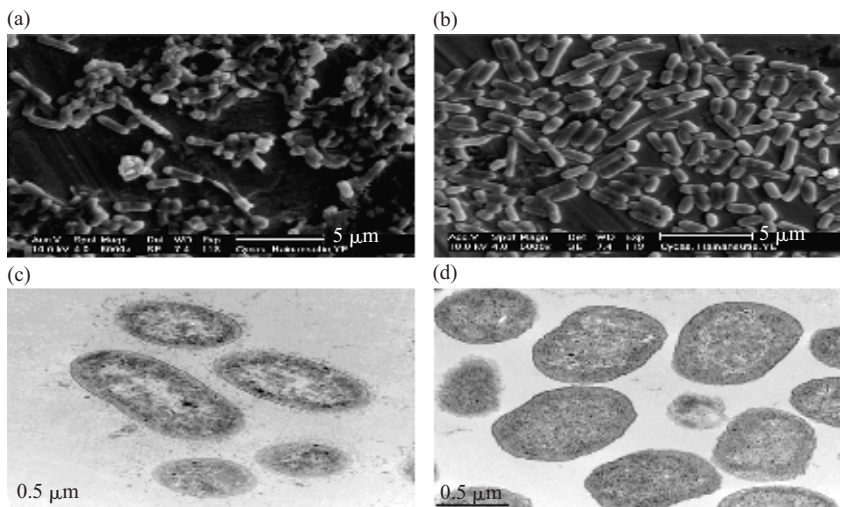


Fig. 4 Electron microscope of *E. coli* F41 after treated 3 h with tachyplesin and untreated (6000×)
(a) Scanning electron microscope of *E. coli* F41 after treated 3 h with tachyplesin. (b) Scanning electron microscope of *E. coli* F41 untreated. (c) Transmission electron microscope of *E. coli* F41 after treated 3 h with tachyplesin. (d) Transmission electron microscope of *E. coli* F41 untreated.

经鲨素处理的金黄色葡萄球菌在扫描电镜下观察, 其菌群结构与未处理组相比, 无明显差异(图 5a、图 5b); 但在同一鲨素浓度下, 透射电镜可观察到处理组菌体发生明显变化, 如细胞表面出现较多丝状突起, 细胞壁膜内缢痕区域遭到较大破

坏, 细胞质结构松弛, 细胞核区消失(图 5c); 而对照组细胞结构完整, 可清楚看到细胞壁膜结构, 细胞核区明显, 胞质致密充实, 细胞常见分裂状态(图 5d).

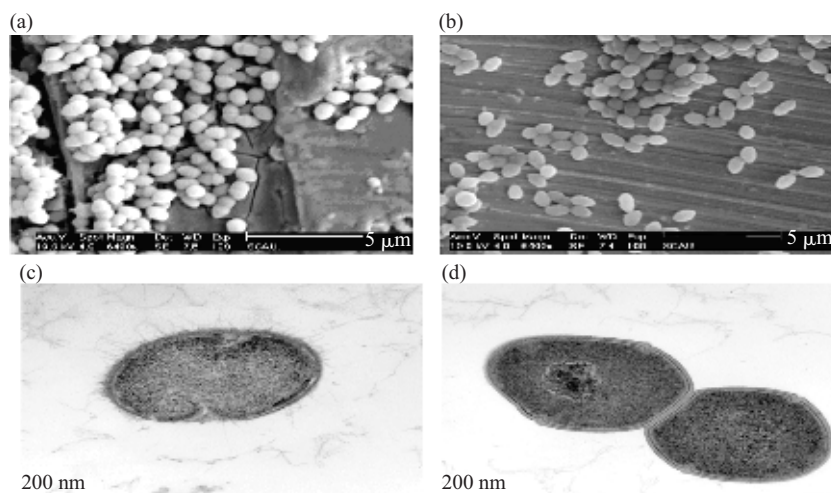


Fig. 5 Electron microscope of *S. aureus* after treated 3 h with tachyplesin and untreated (6000×)

(a) Scanning electron microscope of *S. aureus* after treated 3 h with tachyplesin. (b) Scanning electron microscope of *S. aureus* untreated. (c) Transmission electron microscope of *S. aureus* after treated 3 h with tachyplesin. (d) Transmission electron microscope of *S. aureus* untreated.

2.4 鲨素对细菌 DNA 结构的影响

鲨素对大肠杆菌 F41 基因组 DNA 增色效应的影响见图 6. 随着鲨素与细菌 DNA 作用时间延长, 细菌基因组 DNA 产生明显的增色效应.

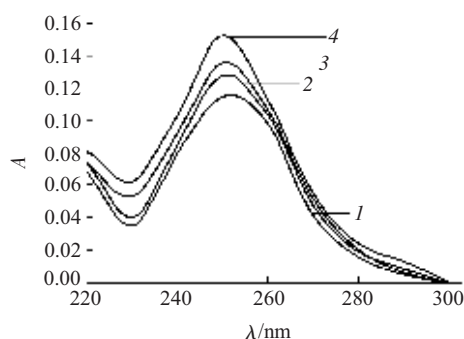


Fig. 6 Ultraviolet absorption spectra of the interaction between tachyplesin and *E. coli* F41' DNA

1: 3 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 18 h.

鲨素对细菌质粒 DNA 凝胶迁移的影响见图 7. 1~3 泳道未发现 DNA 条带; 4、5 泳道 DNA 条带具有明显的阻滞现象, 螺旋、环型质粒条带基本消失, 而在 19 329 bp 左右出现明显条带; 6~9 泳道

能看出螺旋、环型、线型三种形式的质粒图谱, 且 6~9 泳道质粒亮度逐渐增大, 尤其是螺旋型质粒变化明显.

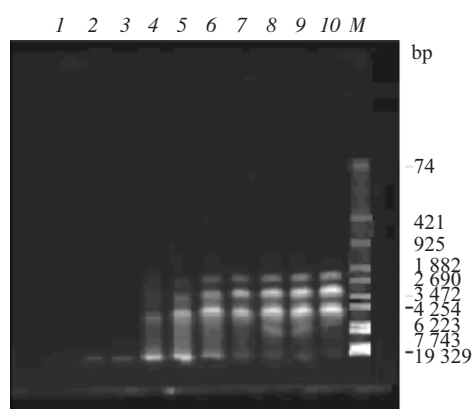


Fig. 7 Agarose electrophoresis of the interaction between tachyplesin and plasmid DNA PUC-18

1: 640 mg/L; 2: 320 mg/L; 3: 160 mg/L; 4: 80 mg/L; 5: 40 mg/L; 6: 20 mg/L; 7: 10 mg/L; 8: 5 mg/L; 9: 2.5 mg/L; 10: H₂O; M: *Eco*T14 I digest marker.

鲨素对细菌质粒 DNA 复制和转录的影响见表 1. 高浓度(80~640 mg/L)鲨素处理后的质粒转

化大肠杆菌 Top10，无阳性克隆出现；低浓度（2.5~40 mg/L）螯素处理后质粒样经转化 Top10，出现少量阳性克隆；未经螯素处理的对照样质粒转化 Top10，阳性克隆明显高于低浓度螯素处理组。

Table 1 Concentration of plasmids PUC-18 by treating with different concentration of tachyplesin

ρ (Tachyplesin)/(mg·L ⁻¹)	640	320	160	80	40	20	10	5	2.5	0
ρ (Plasmids)/(mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	0.61	0.85	1.46	1.85	1.62	2.50
$A_{260/280}$	-	-	-	-	1.54	1.68	1.72	1.82	1.80	1.92

3 讨 论

目前揭示抗菌肽杀菌机制的学说主要有：a. 孔洞学说，如防御素(defensin)通过静电作用于电负性细菌膜磷脂头部，然后疏水部分插入平面双脂层或脂质体，形成瞬间通道或孔洞^[12]。b. 离子通道学说，如天蚕素 A(*cecropin A*)首先靠静电吸引结合到细菌膜表面，接着分子疏水端插入胞膜，然后两性 α 螺旋结构区插入胞膜，多个天蚕素 A 共同形成离子通道^[13]。c. 可变“毯”学说，肽相通过与膜脂相互作用破坏膜屏障而不是形成通道，只有当抗菌肽达到一定浓度才能诱发膜变化。抗菌肽先是聚集覆盖在膜表面，多个抗菌肽形成肽聚体，直至触发浓度(即当抗菌肽饱和了膜表面)，肽聚体相互协作，向内部塌陷，毁坏膜屏障^[14]。d. 抑制细胞壁形成学说，比如麻蝇毒素 II (*sarcotoxins II*)只对少数革兰氏阳性菌有作用，主要抑制细菌正在形成的细胞壁，而对已形成的细胞壁没有作用^[15]。e. 抑制细胞呼吸学说，如从刺肩蜡(*Podisus maculicentris*)成虫分离得到的死亡素 Thanatin，无论多高浓度对细菌作用时，均检测不到细胞内 K⁺ 的外流，证明胞膜不是其作用靶点，但 40 μ mol/L 死亡素处理细菌 1~6 h，细菌呼吸减弱直至完全停止^[16]。抗菌肽结构的多样性决定了其杀菌机制的多样性，不可能存在一个统一的学说来解释所有抗菌肽的杀菌机制。

本实验首次观察了螯素抑杀细菌作用的动力学特点，发现螯素对大肠杆菌 K88 和 F41 均在 10 h 左右出现一个抑菌最高峰，而对枯草杆菌 WB800 和金黄色葡萄球菌出现两个抑菌活性峰(图 1)。该结果提示，螯素对革兰氏阳性和阴性菌的抑菌动力学存在着明显不同，可能与这两类细菌的细胞壁膜构造不同有关，初步提示细胞壁膜是螯素杀菌的靶点。

细菌细胞膜通透性变化和细菌超微形态结构变化也为细菌壁膜是螯素杀菌的靶点提供了证据。首

先，螯素可引起金黄色葡萄球菌小分子物质(无机磷)外泄(图 2)和大肠杆菌 K88 胞内紫外吸收物质外泄(可能是核酸或者蛋白质等)(图 3)，提示螯素可引起细菌细胞膜通透性发生较大的变化。其次，螯素可使细菌壁膜形态和结构发生显著变化(图 4 和图 5)，尤其是螯素作用于 F41 后大部分菌体变得不完整，胞浆外泄，菌群粘连，提示螯素已引起细菌细胞壁膜的不同程度的破裂。Hirakura 等^[17]研究表明，螯素与细菌细胞膜上的类脂形成肽脂超分子复合体，使脂和肽相互耦合，实现螯素的跨双层膜运输(转移)作用。肽分子由膜外表面翻转 to 膜内侧时，带动类脂一起翻转，进入胞内，但细菌的细胞膜并不破裂。该研究结果显然与本次实验现象不太一致，这可能与研究所用菌种差异、螯素作用浓度以及螯素作用时间不同等有关。该推测可由本次实验结果证实。首先，螯素诱导的大肠杆菌 K88 胞内紫外吸收物质发生外泄的数量，除了与螯素作用浓度有关外，也受螯素的作用时间因素的影响，如图 3 所示，当螯素浓度为 20 mg/L 和 40 mg/L 时，作用时间大于 10 h 时，大分子泄漏随时间延长而显著增高。其次，螯素对大肠杆菌 F41 和金黄色葡萄球菌抑菌动力学特点明显不同(图 1)；螯素对大肠杆菌 F41 和金黄色葡萄球菌的形态结构影响也有一定的差异，对 F41 细胞壁膜的破坏程度明显大于金黄色葡萄球菌(图 4 和图 5)。螯素为何造成菌体磷泄漏以及泄漏磷来源于细菌中哪种物质需要进一步研究。

胞内遗传物质 DNA 是螯素杀菌的另外一个作用靶点，本文中的几个实验现象从不同方面证实螯素可以作用于细菌 DNA 分子。首先，螯素可使 DNA 产生增色效应，且随着二者共处时间延长，DNA 增色效应增强(图 6)。其次，一定浓度范围内的螯素可以使细菌质粒 DNA 凝胶迁移速率变慢(图 7)。再次，螯素对细菌质粒 DNA 复制和转录具有明显抑制作用(表 1)。螯素如何作用于细菌 DNA 分子，有待于进一步研究。

值得注意的是, 本次研究首次表明, 高浓度蜚素对细菌 DNA 可能具有断裂作用(图 7)。这一推论似乎也能从透射电镜图 4c 和图 5c 得到印证, 图 4 和图 5 比较清楚地表明, 蜚素可使细菌的细胞核区消失。王芳等^[18]通过 SCGE 法观察到抗菌肽 CM₄ 组分对 K562 癌细胞染色质 DNA 具有明显的断裂作用。迄今为止, 尚无抗菌肽断裂细菌 DNA 分子的相关报道, 蜚素是否能够断裂细菌的 DNA 分子以及如何断裂细菌 DNA 分子尚需进一步深入研究加以证实。

综合上述观点, 细菌细胞壁膜和菌体内的 DNA 是蜚素杀菌的两个作用靶点, 蜚素杀菌机理至少是这两个方面协同作用的结果。这两方面的作用对蜚素抑杀细菌的贡献各有多大, 还需要进一步研究确定。此外, 蜚素杀菌作用是否还存在其他靶点, 比如功能蛋白或者线粒体等, 需要进一步研究证实。

参 考 文 献

- Steiner H, Hultmark D, Boman H G, *et al.* Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, **292**(5820): 246~248
- Lehrer R I, Barton A, Daher K A, *et al.* Interaction of human defensins with *Escherichia coli*: mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*, 1989, **84**(2): 553~561
- Park Y, Lee D G, Janq S H, *et al.* A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1645**(2): 172~182
- Nakamuro T, Furunaka H, Miyata T, *et al.* Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). *J Biol Chem*, 1988, **263**(32): 16709~16713
- Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**(1): 87~95
- Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, *et al.* Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II. Chemical structures and biological activity. *J Biochem*, 1989, **106**(4): 663~668
- Morimoto M, Mori H, Otake T, *et al.* Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human-immunodeficiency virus *in vitro*. *Experimental Chemotherapy*, 1991, **37**(3): 206~211
- 李祺福, 欧阳高亮, 鲍仕登, 等. 中国蜚素对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用. *中国海洋药物*, 2002, **86**(2): 22~25
Li Q F, Ouyang G L, Bao S D, *et al.* *Chin J Marine Drugs*, 2002, **86**(2): 22~25
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, *et al.* Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, **106**(1): 7~16
- 陈念, 高向阳, 林壁润. 万隆霉素抑制细菌的作用机理初探. *西北农林科技大学学报*, 2005, **33**(s): 144~148
Chen N, Gao X Y, Lin B R. *J Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2005, **33**(s): 144~148
- 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 抗菌活性肽与细菌染色体 DNA 的相互作用机理. *自然科学进展*, 2004, **14**(5): 509~513
Gong X, Shi Y H, Le G W. *Progress in Natural Science*, 2004, **14**(5): 509~513
- Hara S, Yamakawa M. Moricin. A novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem J*, 1995, **310**: 651~656
- Christensen B, Fink J, Merrifield R B. Channel-forming properties of cecropins and related compounds incorporated into compounds into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5072~5076
- Shai Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**: 460~464
- Ando K, Naton S. Inhibitory effect of sarcotoxin II A, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1988, **103**: 735~741
- Fehlbaum P, Bulet P, Gudmundsson G H. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1221~1225
- Hirakura Y, Kobayashi S, Matsuzaki K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic β -sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1562** (1~2): 32~36
- 王芳, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM₄ 组分对 K562 癌细胞染色质 DNA 断裂作用的 SCGE 研究. *生物化学与生物物理进展*, 1998, **25**(1): 64~67
Wang F, Zhang S Q, Dai Z Y. *Prog Biochem Biophys*, 1998, **25**(1): 64~67

Preliminary Study on Antibacterial Targets of Tachyplesin*

DAI Jian-Guo^{1)**}, XIE Hai-Wei^{1,2)**}, JIN Gang^{1)***}, ZHANG Yan¹⁾, ZHU Jun-Chen¹⁾, GUO Yong²⁾

¹⁾School of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China;

²⁾College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract Tachyplesin is a 17-aa peptide, isolated from marine “living fossil” horseshoe crab, *Tachyplesus tridentatus*, showing wide-spectrum antibacterial activity. However, its mechanism of killing bacterium is not very clear. The aim was to investigate the targets of tachyplesin for further studying the antibacterial molecular mechanism. *In vitro* bacterial inhibition method was used to determine feature of bacterial inhibition dynamic of tachyplesin. Inorganic phosphate measurement and ultraviolet absorption methods were used to observe the leakage of inorganic phosphorus and large mass molecular before and after bacterium were incubated with tachyplesin. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were adopted to investigate the morphologic and structural changes of bacterium before and after being incubated with tachyplesin. Ultraviolet absorption method and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were used to investigate the effect of tachyplesin on structure of genomic DNA and plasmid DNA of bacterium. Plasmid transformation method was applied to observe the effect of tachyplesin on copy and transcription of plasmid DNA. The results showed that, (1) Tachyplesin had different feature of bacterial inhibition dynamic in Gram positive and negative bacterium. In the Gram positive bacterium (*E. coli* K88 and *E. coli* F41), the antibacterial activity of tachyplesin increased sharply during the first 10 h, and was in the plateau phase during 10~30 h, and then decreased slowly. In the Gram negative bacterium (*B. subtilis* W B800 and *S. aureus*), the antibacterial activity of tachyplesin increased sharply during the first 3 h, and decreased during 3~10 h, and increased again during 10~15 h, the trend was similar to the Gram positive bacterium after 20 h. (2) Bacterium lost inorganic phosphorus and large mass molecular. Phosphorous concentration in the culture media of *S. aureus* was significantly higher after treated with tachyplesin, the high concentration could keep long time (30 h later). The concentration of the UV absorbing substance in *E. coli* K88 became higher and higher depending on tachyplesin concentration and time. At low tachyplesin concentration, the UV absorbing substance concentration kept low. (3) The structure of cell wall, cell membrane and the whole cell body were damaged to some extent after treated by tachyplesin. (4) Tachyplesin could combine with genomic DNA and plasmid DNA of bacterium, high concentration of tachyplesin probably could break down DNA, and inhibited copy and transcription of plasmid DNA. It was suggested that the antibacterial targets include at least cell wall and membrane and DNA of bacterium.

Key words tachyplesin, antibacterial target, cell wall, cell membrane, DNA

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Guangdong Province (05300281, 04011209) and The Science Technology Plan of Shenzhen (05KJBB003).

**DAI Jian-Guo and XIE Hai-Wei equally contribute to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-755-26019267, E-mail: jingang@oa.szpt.net

Received: October 15, 2007 Accepted: December 13, 2007