

文章编号: 1000-1190(2010)03-0460-03

电子显微镜观察抗菌肽抗菌机理

乔媛媛¹, 曹卫友³, 张玉梅¹, 李娜¹, 彭建新^{2*}

(1. 滨州医学院 病原生物学教研室, 山东 烟台 264003;

2. 华中师范大学 农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079;

3. 滨州医学院 中西医临床教研室, 山东 烟台 264003)

摘 要: 电子显微镜观察正常生长的大肠杆菌在受到抗菌肽作用后, 在不同时间里, 被作用的大肠杆菌形态有很大的差异. 大肠杆菌被抗菌肽作用 30 min 后在形态上看不到明显的变化, 而作用过夜后(约 12 h)细菌内部电子密度增强, 质壁出现分离, 细胞壁出现空泡并且界限模糊. 作用 16 h 以上电子密度进一步增强, 细菌走向老化死亡趋势, 说明抗菌肽使细菌细胞膜的通透性发生了改变.

关键词: 离体细胞; 抗菌肽; Tricine-SDS-PAGE; 电子显微镜

中图分类号: Q-336; Q58

文献标识码: A

研究发现, 从低等的细菌、线虫、水生动物、昆虫、蛙到植物、哺乳动物以及人类细胞都能产生抗菌肽^[1-2]. 抗菌肽作为阳离子两性多肽, 具有广谱抗细菌、真菌、病毒、原生动物、寄生虫的活性^[3-4].

对抗菌肽作用机理的研究多集中在利用先进仪器设备来观察抗菌肽与细胞质膜间的作用细节, Kim 等利用 AFM, 清楚地显示抗菌肽影响 LPS 和免疫蛋白(LBP 和 CD14)间的分子相互作用, 当抗菌肽 polymyxinB 达到或高于某一阈值, 能够特异地抑制 LBP-LPS 与 CD14 间的结合能力. 利用 NMR 谱阐述抗菌肽 arenicin 与革兰氏阴性菌或与重组膜的相互作用. 同时利用 AFM 和电子显微镜超微分析 arenicin 处理的细菌^[5].

利用染料渗透检测、荧光光谱法、圆二色、差式扫描量热、NMR 谱分析, dermaseptinB2 干扰阴离子脂质双层, 聚集在平面膜的亲水面, 平行于平面膜, 与极性头部及阴离子磷脂的甘油骨干相互作用, 尤其与脂质双层表面的脂质酰基链相互作用, 当肽量积累到一定阈值, 导致形成间歇性孔洞以及膜渗透/破坏^[6].

本研究室采用高分辨率的透射电子显微镜来观察抗菌肽作用细菌后导致细菌的形态变化以及是否导致细胞膜的通透性改变.

1 材料与方法

1.1 材料

粉纹夜蛾 Tn-5B1 细胞由 Cornell 大学 Grana-dos 教授馈赠; 大肠杆菌 DH5 α 系本实验室保存菌株; 细胞培养所用培养基为辅加 10% 胎牛血清的 Grace 培养基. 爪蟾卵母细胞系华中科技大学同济医学院提供.

1.2 Tn-5B1 细胞的转瓶培养

将 8 瓶 25 mL 细胞培养瓶中处于对数生长期的细胞作为种子细胞(2.1×10^5 个/mL), 转移到加有 200 mL 10% 胎牛血清 Grace 培养基的 3 L 转瓶中, 在转速为 2/3 r/min, 28℃ 条件下培养. 旋转培养 4 d 后, 可看到细胞均匀地贴附转瓶壁(1.4×10^5 个/mL), 以备诱导.

1.3 大肠杆菌 DH5 α 的培养与制备

将 DH5 α 接种于 LB 培养基中, 在 37℃, 150 r/min 恒温摇床培养过夜, 离心取沉淀, 121℃ 20 min 灭活备用.

1.4 电子显微镜观察抗菌肽作用细菌后的形态变化

取对数生长期的 E. coli, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 溶解的抗菌物质稀释此菌, 含量为 10^8 个/mL. 置于恒温摇床 150 r/min

收稿日期: 2010-01-29.

基金项目: 科技部重大基础研究 973 前期项目(2002CCA02400).

* 通讯联系人, E-mail: jianxinpeng@21cn.com.

过夜,4000 g 离心 10 min 收集细菌,沉淀经 3% 戊醛固定后,树脂包埋,超薄切片后放置铜网中,日立-7000 透射电子显微镜进行观察拍照。

2 结果

2.1 诱导的昆虫离体细胞分泌抗菌肽

粉纹夜蛾昆虫离体细胞 Hi5 细胞经灭活大肠杆菌诱导后,16 h 后 Hi5 细胞分泌抗菌活性物质,经过抑菌试验和 Tricine-SDS-PAGE 电泳^[7]分析,证实抗菌活性物质为分子量约 7 000 的多肽。

2.2 电子显微镜观察抗菌肽作用的细菌形态变化

正常生长的大肠杆菌在受到抗菌物质作用后,在不同时间里,被作用的大肠杆菌形态有很大的差异。大肠杆菌被抗菌肽作用 30 min 后看不到明显的变化,而作用约 12 h,细菌内部电子密度增强,质壁出现分离,细胞壁出现空泡并且界限模糊。作用 16 h 以上电子密度进一步增强,细菌趋向老化或死亡。

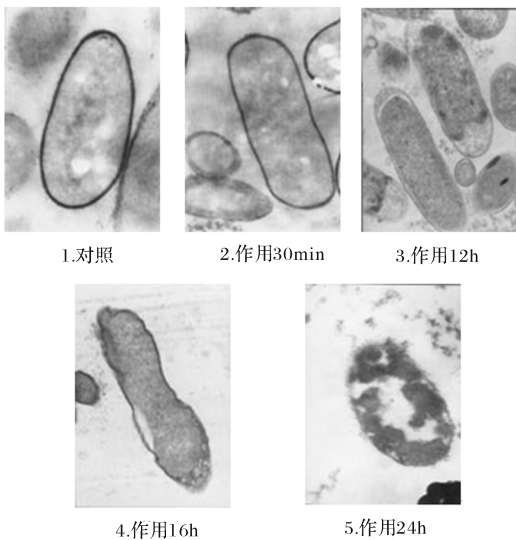


图 1 抗菌活性物质作用细菌的电镜情况

Fig. 1

1 和 5 中 1 cm 代表 μm , 2 和 4 中 1 cm 代表

3.3 μm , 3 中 1 cm 代表 5 μm

3 讨论

最早阐述抗菌肽抗菌机制的学说是 Christensen 等用脂双层详细描述了天蚕素在膜上形成离子通道的现象。抗菌肽 N-端富含亲水性氨基酸残基,特别是碱性氨基酸,如 lys、Arg,而 C-端则含较多疏水性氨基酸,末端都酰胺化。在静电作用下,抗菌肽带正电荷的部分与细菌表面带负电荷的磷脂头结合,疏水的 C 端 α 螺旋插入疏水的细菌细

胞膜中央,大量的肽分子聚合形成孔道,导致细胞内阳离子大量外流,细胞内 ATP 合成速度下降,细菌呼吸系统受到抑制,细菌死亡^[8]。

普遍接受的观点是某些阳离子两性多肽通过破坏细胞膜,使得细胞内外的离子进行自由交换,该类肽以形成毯式或环形孔式插入脂质膜,进一步研究发现形成跨膜孔并不是该类肽唯一的杀菌机制,多次试验表明该转位肽能够改变细胞质膜隔的形成,抑制细胞壁的形成,抑制核酸的形成,抑制蛋白质的合成或酶的活性^[2,9]。而抗菌肽 arenicin 杀菌迅速,发生在数分钟内,该过程伴随着膜通透性的改变,膜的分离以及胞质的释放^[10]。

针对抗菌肽导致细菌形态的变化,我们采用透射电子显微镜来进行研究,对细菌进行超薄切片观察,结果发现细菌经抗菌活性物质作用后,细菌的渗透性发生了改变,并且细菌体内的电子密度增强,说明细胞膜的通透性发生了改变,而且细菌逐渐走向老化死亡。

电镜技术从抗菌物质作用于细菌后的细菌形态学的变化,反映了细菌走向死亡的整个过程。推测细胞经抗菌物质作用后,细胞膜产生了某种离子通道,至于为哪种离子通道,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Chen L, Li Y, Li J, et al. An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* [J]. *Peptides*, 2007, **28**(8):1527-1531.

[2] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(3):238-250.

[3] Andr  s E, Dimarcq J L. Cationic anti-microbial peptides: from innate immunity study to drug development [J]. *Rev Med Interne*, 2004, **25**(9):629-635.

[4] L  fgren S E, Miletti L C, Steindel M, et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals [J]. *Exp Parasitol*, 2008, **118**(2):197-202.

[5] Kim J S, Jang S, Kim U, et al. AFM studies of inhibition effect in binding of antimicrobial peptide and immune proteins [J]. *Langmuir*, 2007, **23**(21):10438-10440.

[6] Galanth C, Abbassi F, Lequin O, et al. Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain [J]. *Biochemistry*, 2009, **48**(2):313-327.

[7] Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. *Anal Biochem*, 1987, **166**:368-379.

[8] Christensen B, Aink J, et al. Channel-forming properties of

cecropins and relates membranes and related model compounds incorporated into planar lipid membranes[J]. Proc Natl Acad Sci, 1988,**85**:5072-5076.

[9] Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use[J]. Bio Drugs, 2003,**17**(4):233-240.

[10] Andra J, Jakovkin I, Grotzinger J, et al. Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin[J]. Biochem J, 2008,**410**(1):113-122.

The role of electron microscopy in the mechanism of antibacterial activity of peptide antibiotic against E. coli

QIAO Yuanyuan¹, CAO Weiyou³, ZHANG Yumei¹, LI Na¹, PENG Jianxin²

- (1. Teaching and Research Section of Pathogenic Biology, Binzhou Medical University, Yantai Shandong 256603;
2. Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, Huazhong Normal University Wuhan 430079;
3. Clinical Teaching Section of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai Shandong 256603)

Abstract: The mechanism of antibacterial peptide can be studied by electron microscopy. Great changes have taken place of the bacteria configuration. Interior of the bacteria became the division between cell wall and cell membrane, the electron density turned deeper, bacteria were aging and dead in sixteen hours. Our data suggest that membrane interaction plays a pivotal role in the antibacterilal activity of peptide antibiotic against E. coli.

Key words: insect cell line; antibacterial peptide; tricine-SDS-PAGE; electron microscopy

(上接第 459 页)

Detection of D1 protease by high performance capillary electrophoresis

ZHANG Yanmei¹, CHEN Layue¹, LI Weiguo², GUO Jianjun¹, LIU Zhonglai¹,
YAO Hancha¹, LIU Yanli¹, QI Chao¹

- (1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan 430079;
2. College of Chemistry, Huazhong Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: The fusion protein pET-28a-ctpA and pET-23a-ctpA were expressed under low temperature, the expressed proteins were purified with affinity chromatography, desalted with Histrap FF and concentrated. The fusion proteins were detection by high performance capillary electrophoresis, a fluorospectrophotometer was employed to determine the structure of the reaction products at the same time to confirm the observation results obtained by CZE. HPCE analysis showed that the migrate time of two fusion protein is different in the same pH of running buffer, the migrate time of one fusion protein was not significant difference when the pH of running buffer is changed with some range. It indicated that the main effect factor of migrate time is structure and the structure of two fusion protein is different.

Key words: D1 protease; fusion protein; HPCE