

凡纳滨对虾抗菌肽的筛选及与 DNA 的结合机制

王铭遥¹, 郑明静^{1,2,3}, 任中阳^{1,2,3}, 石林凡^{1,2,3}, 邓尚贵⁴, 杨 燊^{1,2,3*}

¹集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021

²福建省食品微生物与酶工程重点实验室 福建厦门 361021

³大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034

⁴浙江兴业集团 浙江舟山 316014)

摘要 探究凡纳滨对虾中一种新型抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的抑菌活性及与 DNA 的结合机制。采用超高效液相色谱-质谱联用技术鉴定凡纳滨对虾体内小分子多肽序列,并采用生物信息学从序列库中分析、筛选得到阳离子抗菌肽 PV13 (ALPWVLPWALPRALPRVLPR)。通过最低抑菌浓度(MIC)和时间杀伤曲线(Time-kill)测定抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的 MIC 为 62.5 μg/mL,可在 2 h 内将副溶血性弧菌全部杀灭。采用透射电子显微镜观察、细胞内膜通透性测定、DNA 凝胶阻滞和圆二色谱仪等评价抗菌肽对副溶血性弧菌的抑菌机制。结果表明,抗菌肽 PV13 能增加副溶血性弧菌细胞膜内膜的通透性,使得细胞膜变薄,从而进入细胞,与基因组 DNA 结合来体现其抑菌活性,二者结合程度与肽浓度呈正相关。抗菌肽 PV13 在 PBS 和 SDS 溶液中均呈无规则卷曲结构,与副溶血性弧菌基因组 DNA 结合后,色谱吸收峰发生明显变化。推测序列中 4 个重复的亮氨酸-脯氨酸区域可能是其抑菌活性功能域。上述结果对凡纳滨对虾中抗菌肽的筛选及其分子设计具有指导意义,同时也为抗菌肽 PV13 作为食品新型防腐剂的应用提供理论支持。

关键词 凡纳滨对虾; 副溶血性弧菌; 抗菌肽; 抑菌活性; DNA 结合机制

文章编号 1009-7848(2023)07-0140-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.015

食源性疾病是一个全球性的公共卫生问题,每年约有 420 万人因食物中毒而死亡^[1]。虽然我国食源性疾病的发生率整体呈下降趋势,但是部分地区形势仍然不容乐观,特别是由细菌引起的食物中毒事件频频发生^[2]。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是变形菌门的一种游动的、非孢子形成的、杆状革兰氏阴性菌,有嗜盐和嗜温的特性,它作为海洋食品主要的食源性致病菌,引起的食物中毒事件占水产食物中毒的 60%以上^[3-4]。该菌通过侵入宿主细胞(肠上皮细胞),在体内释放大量毒力因子,导致宿主细胞死亡,进而引起肠胃炎等疾病^[5-6]。

抗菌肽(AMPs)也被称为宿主防御肽,广泛存在于自然界的各种生物体内,是机体先天性免疫系统的重要组成部分^[7]。抗菌肽因快速、广谱的抑菌活性和独特的抑菌机制而被认为是化学防腐剂潜在的替代品^[8-9]。例如,抗菌肽 mBjAMP1 可在短

时间内杀灭革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性细菌大肠杆菌,展现出较强的广谱抑菌活性^[10]。凡纳滨对虾又称南美白对虾,是对虾科的一个重要经济虾种,2020 年我国对虾的年总产量高达近 120 万 t^[11]。副溶血性弧菌作为凡纳滨对虾的主要感染细菌,严重威胁着对虾及其加工制品的食用安全。有研究发现,凡纳滨对虾感染副溶血性弧菌后,其血清中能产生一定数量的抗菌片段来应对感染^[12]。如凡纳滨对虾抗菌肽 LvALF8LBD 对大肠杆菌、哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等展现出良好的广谱抑菌活性^[13]。虽然人们在海洋无脊椎动物中发现了许多抗菌肽,但是发现数量远不及陆地动物,其原因是海洋无脊椎动物中抗菌肽的质量浓度通常小于 1 mg/kg,且提取工艺复杂,很难从海洋无脊椎动物中获得足够数量的抗菌肽,用于结构鉴定及抗菌活性测定^[14-16]。相比传统的抗菌肽提取方法,生物信息技术可以提供快速、准确的抗菌肽筛选、识别方法^[17-18]。基于此,本研究通过超高效液相色谱-质谱联用技术鉴定出凡纳滨对虾体内分子质量为 1 500~3 000 u 的多肽片段,再利用生物信息学对

收稿日期: 2022-07-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFD09009)

第一作者: 王铭遥,女,硕士生

通信作者: 杨 燊 E-mail: yangshen@jmu.edu.cn

具有潜在抑菌活性的多肽片段进行评估和筛选,并合成已确定的抗菌肽对象,探索抗菌肽对副溶血性弧菌的抑菌活性及与 DNA 的结合机制,为抗菌肽在食品工业上的应用提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

细菌(副溶血性弧菌 ATCC 17802 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213)由广东省汕头大学海洋生物技术重点实验室提供,并于营养肉汤中,37 ℃条件下培养 24 h;抗菌肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成,纯度 99% 以上;细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Gene Green 核酸染料, TIANGEN 公司;营养肉汤, 广东环凯微生物科技有限公司;琼脂糖, 北京兰博利德生物技术有限公司;所有试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

GelDoc XR 电泳成像系统, 美国 Bio-Rad 伯乐公司; Nano Acquity UPLC system, Thermo Scientific Q-Exactive, 美国 Waters 公司; Chirascan V100 圆二色谱仪, 英国 Applied Photophysics Ltd 公司。

1.3 抗菌肽的质谱分析

将凡纳滨对虾洗净后加入 100 mL PBS 缓冲液(10 mmol/L, pH 7.2)中绞碎, 取 1 mL 绞碎后的悬浊液离心(15 min, 10 000 r/min)取上层清液, 再利用超滤膜截留分子质量为 1 500~3 000 u 的多肽, 所得样品于-20 ℃保存。利用超高效液相色谱-质谱联用技术对多肽的氨基酸序列进行鉴定分析, 液相色谱的流动相分别是含 0.1% 甲醇的超纯水溶液和乙腈, 进样体积为 5 μ L, 梯度洗脱条件如表 1 所示。质谱的一级扫描分辨率为 70 000, 扫描范围是 350~1 600 m/z ; 二级扫描分辨率为 17 500, 动态消除 10.0 s。最后使用搜库软件 MAXQUANT v1.6.5.0 和数据库 Uniprot 白脚虾蛋白库 *Penaeus vannamei* (Whiteleg shrimp) 进行蛋白序列比对^[19]。

1.4 生物信息学筛选及合成

分别使用在线软件 APD3(<https://aps.unmc.edu/AP/>)和 CAMP(<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>)计算多肽的电荷数和疏水率, 并评估其抗菌肽的

表 1 液相色谱的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution procedure of liquid chromatography

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	A/%	B/%
0	0.25	98	2
1	0.25	98	2
55	0.25	70	30
55.1	0.25	10	90
60	0.25	10	90
60.1	0.25	98	2
70	0.25	98	2

可靠性^[20]。多肽采用固相合成法合成, 首先将 9-苄基甲氧羰基氨基酸(甲氨基甲酸)和 2,6-二氯苯甲酰氯(DCB)添加到树脂中以附着第 1 个氨基酸, 再向其中加入哌啶脱去保护基, 不断搅拌将活化的氨基酸连接到树脂上以偶联下一个氨基酸残基, 如此往复循环, 直至目标肽段全部合成, 最后用 TFA 将目标肽段从树脂上切下得到较低纯度的多肽。利用高效液相色谱法(HPLC)纯化目标肽段, 使其纯度 $\geq 99%$, 通过超高效液相色谱-质谱联用仪测定纯化合成多肽的分子质量^[21]。

1.5 PV13 抑菌活性分析

1.5.1 最低抑菌浓度(MIC) 取 200 μ L 副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌分别加于 20 mL 营养肉汤液体培养基中, 37 ℃振荡培养 13 h 至细菌的对数生长期, 再用 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液稀释细菌浓度至 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。取 1 mg 抗菌肽于离心管中, 加入 1 mL 的磷酸盐缓冲液使其溶解。将稀释过的细菌和抗菌肽等比例混合, 使抗菌肽最终质量浓度分别为 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μ g/mL, 并于 37 ℃条件下静置孵育 2 h。充分反应后取 20 μ L 样品涂布, 并于 37 ℃生化培养箱中培养 20 h 后, 开始计算菌落总数, 以 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲液代替抗菌肽做空白对照^[22]。

1.5.2 时间杀伤曲线 取 200 μ L 副溶血性弧菌于 20 mL 营养肉汤液体培养基中, 37 ℃振荡培养 13 h 至细菌的对数生长期, 用 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液稀释细菌浓度至 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。将 1 \times MIC 的抗菌肽与 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的副溶血性弧菌等比例混合, 以磷酸盐缓冲液代替抗菌肽做空白对照, 混匀后的样品置于 37 ℃生化培

养箱中孵育,而后分别在 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h 处,取 20 μL 样品加样并涂布,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h 后开始菌落计数^[23]。

1.6 PV13 抑菌机制分析

1.6.1 内膜通透性测定 通过测量副溶血性弧菌细胞质中 β -半乳糖苷酶产生的邻硝基酚含量来确定抗菌肽的内膜通透性。首先将对数生长期的细菌置于离心机中离心 (8 000 r/min, 10 min),使最终菌体沉淀质量大于 0.1 g,接着将菌体沉淀重悬于以乳糖作为唯一碳源的 M9 培养基中,培养至 $\text{OD}_{600} > 0.4$ 。将 100 μL 不同浓度抗菌肽 (1/2×MIC 和 2×MIC)、100 μL 菌悬液与 10 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的 2-硝基苯基- β -D-半乳吡喃糖苷 (*O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG) 溶液吸取到 96 孔板中混匀,立即测定其在波长 420 nm 处的吸光值,完成测定后将细胞悬浮液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养,每 1 h 记录一次数据,以 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲液做空白对照^[24]。

1.6.2 透射电子显微镜观察 将培养至对数生长期的副溶血性弧菌和抗菌肽 PV13 分别用磷酸盐缓冲溶液稀释至 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 和 2×MIC,再按照 5:1 的体积比将二者混合后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 2 h,用磷酸盐缓冲液代替抗菌肽做空白对照。将充分反应的样品离心 (8 000 r/min, 10 min),弃上清液取下层沉淀,采用相同的 PBS 缓冲液洗涤 2 次,体积分数为 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸溶液进行双重固定。之后使用乙醇溶液对样品进行脱水处理,并在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热过夜包埋。最后使用 LEICA EM UC7 型超薄切片机得到 70~90 nm 的切片,切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 5~10 min,晾干后即可用透射电子显微镜观察^[25]。

1.6.3 圆二色谱 取抗菌肽于离心管中,分别加入磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 7.2) 和 25 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶解,使抗菌肽最终质量浓度为 0.2 mg/mL,再吸取 200 μL 溶解后的抗菌肽置于 1 mm 石英比色皿中,在波长为 180~260 nm 条件下 2 次扫描光谱,扫描速度为 130 nm/min,数据以 1 nm 为间隔记录,平均扫描时间为 5 s^[26]。之后用磷酸盐缓冲液溶解后的抗菌肽与副溶血性弧菌基因组 DNA 混合,使其质量比为

37:1,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置孵育 2 h。接着稀释样品最终质量浓度为 0.2 mg/mL,以 SDS 缓冲液稀释的抗菌肽为对照,在圆二色谱仪下扫描,扫描条件如上所述。利用 CD-Tool 软件处理扫描数据,分析抗菌肽结构以及与其副溶血性弧菌基因组 DNA 的结合效果。

1.6.4 DNA 凝胶阻滞 根据 DNA 提取试剂盒方法提取副溶血性弧菌基因组 DNA,通过在波长 260 nm 和 280 nm 处的光度密度比 ($\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} \geq 1.90$) 来测定基因组 DNA 的纯度。取 1 mg 抗菌肽于离心管中,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液溶解,并按照抗菌肽与基因组 DNA 质量比为 100:1, 50:1, 25:1, 25:2, 25:4, 25:8 将二者混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h。而后加入上样缓冲液,用微量移液器吸取 8 μL 加到 0.8% 琼脂糖凝胶样品槽中进行电泳,利用凝胶成像系统在紫外线照射下观察 DNA 迁移结果^[27]。

1.7 抗菌肽三维结构预测

抗菌肽的三维结构由在线软件 I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ITASSER/>) 预测,并在 PyMol 2.3 程序中进行编辑和修改,最终得到抗菌肽结构^[28]。

1.8 数据分析

每次试验独立平行重复 3 次,数据以“平均值 \pm 标准偏差”表示,利用软件 SPSS 22.0 进行统计分析,单因素方差分析 (ANOVA) 检验计算结果显著性, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾中抗菌肽的鉴定与筛选

采用超高效液相色谱-质谱联用技术从凡纳滨对虾中鉴定出 13 个肽段序列 (表 2),多肽序列平均为 20 个氨基酸序列长度,分子质量从 1 500~2 500 u。使用在线软件 APD3 对肽段序列的电荷数和疏水率进行计算,其净电荷数从 -4~+3,疏水率范围从 18%~60%,在线软件 CAMP 测得 13 个肽段的抗菌肽可靠性范围从 0~0.873。

一般来说,抗菌肽的抑菌活性与肽链的长度、净电荷数和疏水性等因素有关^[29]。有研究表明,抗菌肽的长度对于维持构象十分重要,通常较长的肽链更有利于形成特殊的二级结构,然而往往许

多较短的多肽抑菌活性更强, 这些抗菌肽大多由 20~30 个氨基酸序列组成, 分子质量在 2 000~3 000 u 范围内^[30-31]。同时, 净电荷数也是影响抗菌肽抑菌活性的关键因素之一, 阳离子抗菌肽通过和呈负电性的细胞膜之间产生静电吸引作用来发挥抑菌活性, 大多电荷数在+2~+9 之内的抗菌肽具有更强的杀菌效果^[32-33]。此外, 疏水性对抑菌活性的调控也同样重要, 在 30%~60% 范围内, 疏水率与抗菌活性成明显的正相关。然而疏水率较小的抗菌肽, 其与细菌细胞膜之间的相互作用较

弱, 渗透性效应减小, 而高疏水性的抗菌肽可能导致细胞溶血^[34-36]。因此, 只有当抗菌肽的序列长度、电荷数和疏水性等因素达到一个相对平衡的状态时, 才会发挥最大的抑菌活性^[37]。经筛选多肽序列 ALPWVLPWALPRALPRVLPR (命名为 PV13), 其分子质量为 2 320 u, 疏水率为 60%, 带 3 个净正电荷是满足以上条件的唯一肽段序列, 抗菌肽可靠性评估为 0.873 (图 1), 接下来对其抑菌活性做进一步探究。

表 2 凡纳滨对虾中小分子多肽片段的分析筛选

Table 2 Analysis and screening of small molecular peptide sequence from *Penaeus vannamei*

肽段序列	分子质量/u	疏水率/%	净电荷数	抗菌肽可靠性
AFEKSPGKIEAEQFR	1 736	33	0	0.015
DPVLTETHSQFFTNLVFTDIR	2 479	38	-2	0.042
TGSNVFDMFTQKQVAEFK	2 076	38	0	0.005
ELEGQLDDEARRHADAQK	2 080	27	-3	0.073
HAETSSCSVRISESSR	1 735	25	-0	0.001
IEKNIDFQDGRQK	1 590	23	0	0.058
KEWLDMMLEKVSMR	1 795	50	0	0
REEDEYSVAVVGMIFYR	2 062	41	-2	0.001
QFGPPTFPLSCLLTHFPFR	2 204	42	+1	0.075
RQIEEAEEIAALNLAKFR	2 100	50	-1	0.022
SFFEPLSQLVPELTEEEIK	2 331	35	-4	0.032
STGPDPPDTEYLFISR	1 794	18	-2	0.027
ALPWVLPWALPRALPRVLPR	2 320	60	+3	0.873

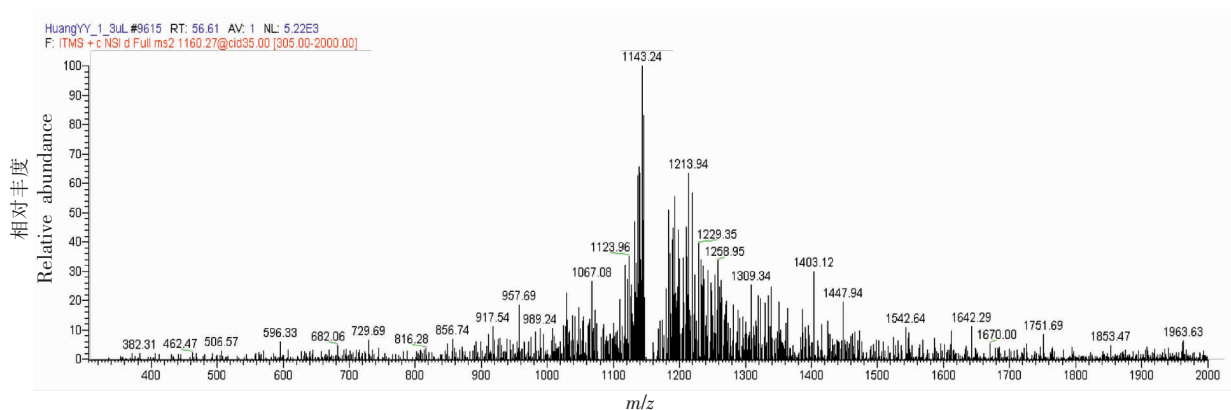


图 1 抗菌肽 PV13 质谱分析图

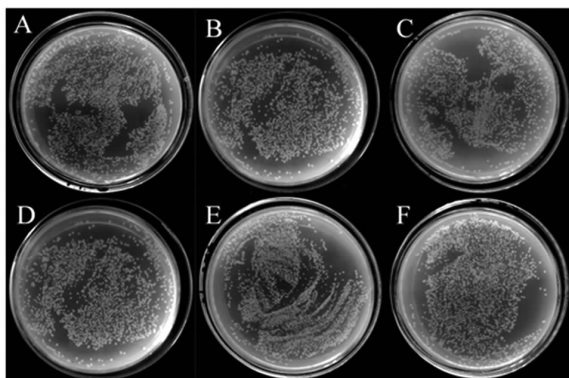
Fig.1 Mass spectrometry analysis of antimicrobial peptide PV13

2.2 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的抑菌活性分析

为探究多肽 PV13 的抑菌活性,对副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度进行测定。多肽 PV13 对金黄色葡萄球菌几乎无抑菌活性(图 2),然而对副溶血性弧菌有较强的抑菌效果。当 PV13 质量浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,副溶血性弧菌总数减少了约 92%;当 PV13 质量浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,副溶血性弧菌减总数少了约 81%;当 PV13 质量浓度为 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,副溶血性弧菌总数减少了约 60%,即随着 PV13 浓度减小,细菌总数随之增多(图 3),由此可以判断 PV13 对副溶血性弧菌的最低抑菌浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

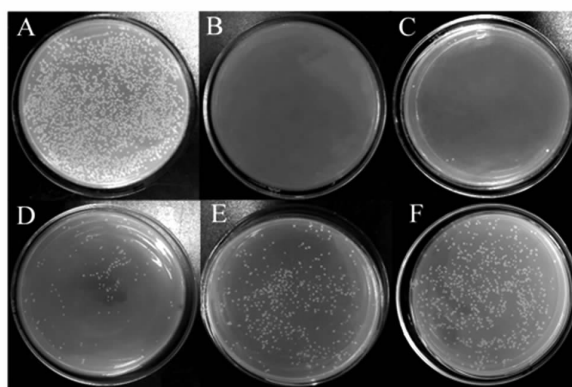
抗菌肽 PV13 对革兰氏阴性菌的抑制效果远优于革兰氏阳性菌,这可能是由于细胞外的独特成分导致,革兰氏阳性细菌表面较厚的肽聚糖层使得抗菌肽很难穿透细胞壁^[38]。而革兰氏阴性菌细胞膜表面特有的成分脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)为抗菌肽的结合提供了更大的可能性,Shang 等^[39-40]证明了抗菌肽可以通过直接结合脂多糖或穿过脂多糖层靶向细胞内功能成分,进而实现对革兰氏阴性菌抑制作用。

从图 4 可知 PV13 对副溶血性弧菌的生长有明显的抑制效果。没加入抗菌肽之前,细菌的时间杀伤曲线较为平缓,仅在 1 h 后有较少的衰亡,加入抗菌肽 PV13 后,曲线呈明显的下降趋势,1 h



注:金黄色葡萄球菌浓度为 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL,图 A~F 表示抗菌肽 PV13 的质量浓度分别为 0,500,250,125,62.5,31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 2 抗菌肽 PV13 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度
Fig.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial peptide PV13 against *Staphylococcus aureus*



注:副溶血性弧菌浓度为 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL,图 A~F 表示抗菌肽 PV13 的质量浓度分别为 0,500,250,125,62.5,31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 3 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的最低抑菌浓度

Fig.3 Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial peptide PV13 against *Vibrio parahaemolyticus*

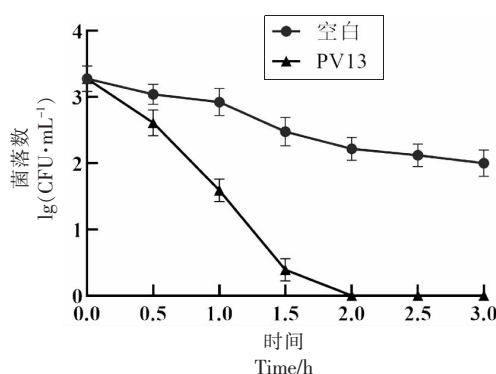


图 4 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的时间杀伤曲线
Fig.4 Time-kill curve of antimicrobial peptide PV13 against *V. parahaemolyticus*

后细菌总数减少了 51.7%,2 h 后细菌全部死亡。结果表明,抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌具有很高的杀菌效率。与本课题组前期发现的泥蚶血红蛋白抗菌肽 TGH1 相比,TGH1 在 5 h 后才杀死 99.1%的副溶血性弧菌,因此 PV13 对副溶血性弧菌的抑菌效率更高^[28]。

2.3 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的抑菌机制分析

2.3.1 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌内膜通透性的影响

β -半乳糖苷酶是一种膜内酶,当细胞内膜产生通透性后,磷脂双分子层间的孔洞扩张, β -半乳糖苷酶泄漏到细胞外,将无色的 ONPG 降解产生黄色的邻硝基苯酚和半乳糖,因此本研究通

过添加 ONPG 来评估抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌内膜通透性的影响^[41]。由图 5 可知,细菌吸光度值整体呈上升的趋势,并且随着抗菌肽 PV13 浓度的增加,细菌的吸光度也随之增大,这表明 PV13 可对副溶血性弧菌的细胞膜通透性产生影响,膜的通透性与 PV13 质量浓度成正比。细胞膜是细胞阻碍外界干扰的第一道屏障,因此大多数已知的抗菌肽直接作用于细胞膜,如抗菌多肽 Hp1404 就是通过靶向鲍曼不动杆菌的细胞膜,使膜的完整性丧失从而发挥其抗菌活性^[42]。然而靶向细胞膜不是抗菌肽唯一的作用机制,抗菌肽 NP-6 通过破坏大肠杆菌细胞膜,抑制了 β -半乳糖苷酶的活性,并与其 DNA/RNA 结合^[43];BO18 也通过穿透溶藻弧菌细胞膜,结合细菌基因组 DNA 和总 RNA 发挥抑菌活性^[44]。然而,抗菌肽 PV13 是否也可以靶向胞内成分尚不清楚。

2.3.2 副溶血性弧菌超微结构变化 为进一步探究抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的作用机制,通过透射电子显微镜观察菌体的微观结构变化。如图 6 所示,未经处理的正常细菌表面完整光滑,组织分布均匀,无内容物流出(图 6a)。而经抗菌肽 PV13 处理后,副溶血性弧菌表面变的模糊,细胞膜部分区域变薄,细胞开始萎缩和变形(图 6b),证实抗菌肽 PV13 可以对副溶血性弧菌细胞膜造成损伤,迫使细胞膜通透性增加,从而加快了细胞内容物的流出和抗菌肽的进入。

由于阳离子型抗菌肽与阴离子型磷脂之间具有较高的亲和力,所以当抗菌肽平行或插入细胞膜后会导致磷脂双分子层中形成一定的“自由空间”,从而容纳更多的抗菌肽。这种现象将直接使细胞膜变薄,膜流动性增加,进而导致细胞膜脂质成分重排,边界产生缺陷^[45]。抗菌肽 P7 也是采用类似的抑菌机制杀灭沙门氏菌,即通过改变沙门氏菌细胞膜的流动性,使抗菌肽进入胞内并在细胞质中积累,从而诱导细胞内容物流出,引起细胞膜通透性增加和变形^[46]。而抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的细胞膜并未产生剧烈的破坏作用,结合时间杀伤曲线和细胞膜通透性结果来看,其可能存在胞内作用机制,因此,对其 DNA 结合活性做进一步探索。

2.3.3 抗菌肽 PV13 与菌体基因组 DNA 的相互

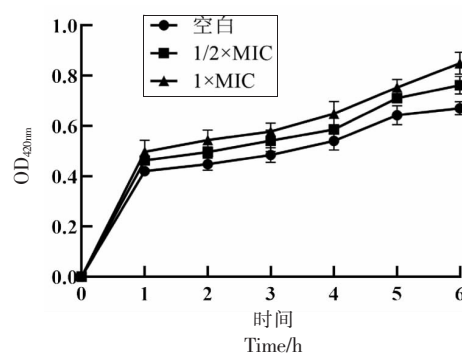
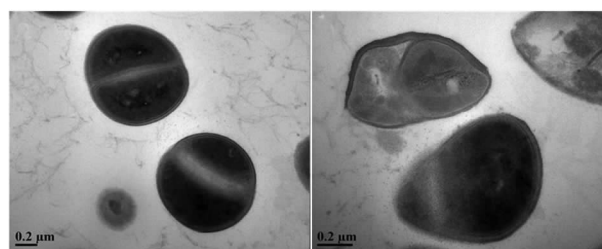


图 5 抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的内膜通透性

Fig.5 Inner membrane permeability of *V. parahaemolyticus* treat with antimicrobial peptide PV13



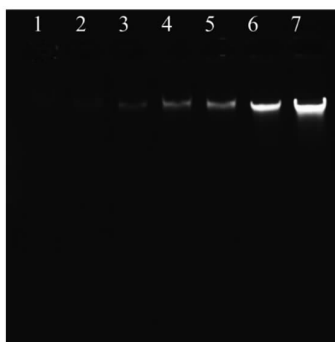
(a)未处理的副溶血性弧菌 (b)经抗菌肽 PV13 处理后的副溶血性弧菌

图 6 副溶血性弧菌的透射电镜图像

Fig.6 Transmission electron microscopy images of *V. parahaemolyticus*

作用 通过 DNA 凝胶阻滞试验来表征抗菌肽 PV13 与副溶血性弧菌基因组 DNA 之间的相互作用。未处理的细菌基因组 DNA,凝胶电泳图谱显示清晰明亮的 DNA 条带,而经抗菌肽 PV13 处理过的基因组 DNA,条带亮度随着 PV13 质量浓度的增大而变暗,说明 PV13 可以直接与副溶血性弧菌的基因组 DNA 结合,且结合程度与 PV13 的质量浓度成正相关(图 7),这与 Yi 等^[47]的研究发现一致,大肠杆菌 O157:H7 基因组 DNA 条带随着 ZP37 浓度的增加而消失。

抗菌肽与细菌基因组 DNA 的结合可以抑制或阻碍细胞基因表达,阻断酶和受体正常合成,进而使细胞生命周期所需物质供应不足,导致细胞死亡^[48]。本课题组前期从大黄鱼乳清酸性蛋白中发现的抗菌肽 LCWAP 就具有 DNA 结合活性,LCWAP 首先通过聚集在细胞表面,破坏细菌细胞膜的完整性,使细胞内容物泄漏形成空泡化,进入细胞后再与基因组 DNA 结合,导致细菌死亡^[49]。



注:条带 1~6:抗菌肽 PV13/DNA 质量比分别为 100:1,50:1,25:1,25:2,25:4,25:8;条带 7:等体积的抗菌肽 PV13 与 PBS 缓冲液。

图 7 凝胶阻滞分析抗菌肽 PV13 与 DNA 的相互作用
Fig.7 Gel retardation analysis of the interaction between antimicrobial peptide PV13 and DNA

苏冠芳等^[50]也发现 buforin II 采用类似于“孔”型机制穿过磷脂双分子层进入金黄色葡萄球菌胞内,并以嵌入的方式与 DNA 合成相关基因特异性结合,从而阻止细胞分裂达到抑菌目的。由此可以推断,抗菌肽除了利用膜损伤机制杀灭细菌之外, DNA 结合活性也是抗菌肽杀灭细菌的有效途径。

2.3.4 抗菌肽 PV13 的结构分析 基于左旋和右旋圆偏振光吸收的差异,圆二色谱已被广泛应用于研究生物分子的构象,特别是用于研究生物分子在各种环境中的构象变化^[51]。远紫外(175~260 nm)范围内的圆二色性(CD)光谱是研究溶液中蛋白质结构的既定方法,因为构成所有蛋白质和寡肽骨架的肽键的构象在远紫外区有特定的 CD 信号^[52]。本课题组前期研究表明,在不同溶液环境中,抗菌肽呈现不同的结构状态,其抑菌活性也各不相同^[53]。如图 8 所示,溶于 PBS 的抗菌肽 PV13 在波长 199 nm 处有 1 个正峰;在 SDS 溶液中,多肽在波长 188 nm 处有 1 个较小的正峰,在波长 202 nm 和 223 nm 处分别有 2 个明显的负峰,其峰形发生明显变化,而以上 2 种峰形都属于无规则卷曲结构,这可能是因为抗菌肽 PV13 序列上存在多个脯氨酸,由于脯氨酸的亚氨基缺少 1 个氢原子,分子无法形成氢键,C-N 键无法旋转,因此脯氨酸的存在会导致抗菌肽无法形成 α -螺旋和 β -折叠等特殊结构^[54]。

抗菌肽的二级结构与抑菌活性密切相关,一

般来说具有特殊结构的抗菌肽(α -螺旋、 β -折叠)的抑菌活性更强^[55],而并非所有抗菌肽都具有特殊的二级结构,对于富含脯氨酸的多肽,结构呈楔形形状,当多肽插入磷脂双分子层后,可进入胞内发挥其抑菌活性^[56]。例如,富含脯氨酸的磁蓖麻毒素通过与 RNA 结合,特异性地抑制蛋白质翻译,从而导致蛋白质合成受到阻碍并最终导致细胞死亡^[57]。以上结果表明,DNA 结合活性可能是富含脯氨酸的无规则卷曲抗菌肽的重要抑菌途径之一。

此外,抗菌肽 PV13 的一级结构是由重复的氨基酸序列串联而成,即每隔 2 个氨基酸就会出现亮氨酸和脯氨酸,形成 X(LP)X 的规律(图 9)。有研究表明,含有 2 个或 2 个以上重复序列的多肽是产生抑菌活性所必需的条件。Sadler 等^[58]把抗菌肽 Bac 7 中大量的脯氨酸-精氨酸(PR)重复区域切除,无论其电荷或疏水含量如何改变,都无法产生抑菌活性。由此推测,重复的亮氨酸-脯氨酸(LP)区域可能是产生抑菌活性的功能区域,这为抗菌肽的设计提供了新的思路。

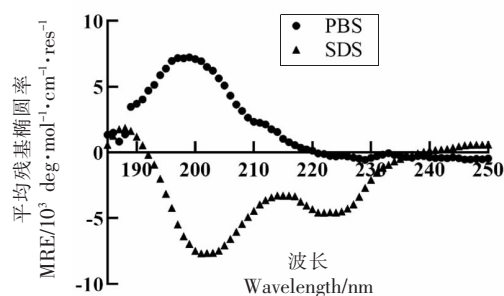
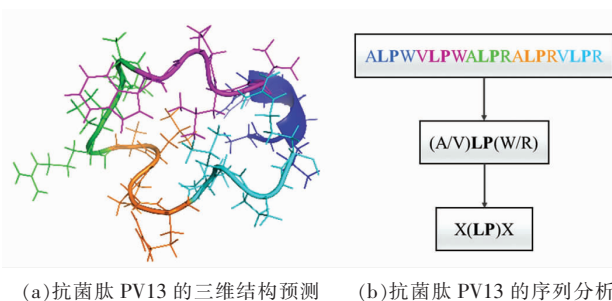


图 8 不同溶液中抗菌肽 PV13 的二级结构分析
Fig.8 Secondary structure analysis of antimicrobial peptide PV13 in different solutions



(a) 抗菌肽 PV13 的三维结构预测 (b) 抗菌肽 PV13 的序列分析

图 9 抗菌肽 PV13 的三维结构预测及序列分析
Fig.9 Three dimensional structure prediction and sequence analysis of antimicrobial peptide PV13

2.3.5 圆二色谱分析 PV13 与菌体基因组 DNA 的相互作用 圆二色谱是评价多肽二级结构的重要工具^[59]。Satish 等^[60]利用圆二色谱法来监测抗菌肽 GDNF 与糖胺聚糖分子形成复合物过程中的多肽构象变化,Contini 等^[61]也采用相同的方法揭示了寡聚体与 DNA 具有形成复合物的能力。由图 10 可以看出,加入副溶血性弧菌基因组 DNA 后,圆二色谱吸收峰强度发生变化,而位移并没有明显改变,主要还是停留在波长 200 nm 附近的无规则卷曲结构,说明 PV13 和副溶血性弧菌基因组 DNA 相互作用后,改变了 PV13 的构象,从而使圆二色谱发生变化,并且此结果也与 DNA 凝胶阻滞试验结果相吻合,进一步证实了抗菌肽 PV13 可以结合副溶血性弧菌基因组 DNA 来发挥抑菌活性。

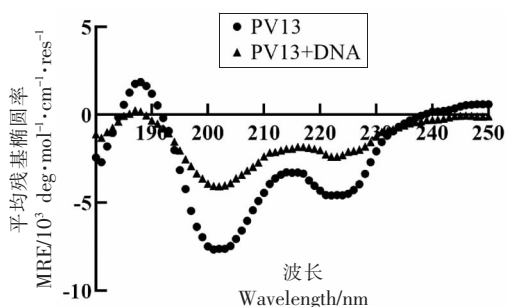


图 10 抗菌肽 PV13 与副溶血性弧菌基因组 DNA 结合的圆二色谱

Fig.10 Circular dichroism of antimicrobial peptide PV13 binding with genomic DNA of *V. parahaemolyticus*

含有 α -螺旋和 β -折叠等特殊二级结构的抗菌肽更容易与细胞膜发生相互作用^[62]。如抗菌肽 PaDBS1R6 的螺旋度与其对大肠杆菌细胞膜的亲和力成正比^[63]。而无规则卷曲的抗菌肽由于没有特殊的二级结构,因此 DNA 结合活性往往是其主要的抑菌作用形式^[64]。这与抗菌肽 buforin II 酰胺具有某些相似之处,二者都呈现无规则卷曲结构并通过结合基因组 DNA 来展现抑菌活性^[65]。因此,PV13 作为一种富含脯氨酸的阳离子抗菌肽,其抑菌机制可能是通过增加细菌细胞膜内膜通透性,引起细胞膜部分区域变薄,再利用亮氨酸-脯氨酸的活性功能域穿透副溶血性弧菌细胞膜进入到胞内,结合基因组 DNA 来杀灭细菌。

3 结论

本研究从凡纳滨对虾体内鉴定出 13 种分子质量介于 1 500~3 000 u 的多肽序列,经分析筛选得到一种新型抗菌肽 PV13。抗菌肽 PV13 对副溶血性弧菌的最低抑菌浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可在 2 h 内将细菌全部杀死,具有良好的杀菌效果。抗菌肽 PV13 通过增加细胞膜内膜通透性,使得细胞膜部分区域变薄,进而利用亮氨酸-脯氨酸(LP)活性功能域快速进入胞内,采用与细菌基因组 DNA 相结合的方式,实现其对副溶血性弧菌的抑菌活性。本研究为抗菌肽的筛选与设计提供了参考,同时也为抗菌肽 PV13 作为食品新型防腐剂的应用提供了理论支持。

参 考 文 献

- [1] LEE H, YOON Y. Etiological agents implicated in foodborne illness world wide[J]. Food Science of Animal Resources, 2021, 41(1): 1-7.
- [2] 孙岩琳. 食源性疾病的流行和监测现状[J]. 食品安全导刊, 2021(Z2): 37.
SUN Y L. Current status of foodborne disease prevalence and surveillance [J]. China Food Safety Magazine, 2021(Z2): 37.
- [3] SU C L, CHEN L M. Virulence, resistance, and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* recovered from commonly consumed aquatic products in Shanghai, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 160: 111554.
- [4] 柴旭锋, 齐家伟, 赵莉, 等. 副溶血性弧菌在鱼鳞表面形成生物被膜的动态过程及酸性电解水对其清除效果[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(5): 792-800.
CHAI X F, QI J W, ZHAO L, et al. Eradication effect of acidic electrolyzed water on *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formed on fish scale surface[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(5): 792-800.
- [5] ZHONG Q P, TIAN J, WANG J, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 induced by food preservative and low temperature[J]. Food Control, 2018, 85: 369-375.
- [6] ZHAO F, DING G Y, WANG Q L, et al. Deletion

- of the *waaf* gene affects O antigen synthesis and pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(2): 418–426.
- [7] 纵瑞, 胡忠泽, 张乃锋, 等. 抗菌肽的抗菌机制及其在反刍动物中应用的研究进展[J]. 饲料工业, 2021, 42(9): 30–35.
- ZONG R, HU Z Z, ZHANG N F, et al. Antibacterial mechanisms of antimicrobial peptides and its application progress in ruminants[J]. Feed Industry, 2021, 42(9): 30–35.
- [8] WANG J, SONG J, YANG Z, et al. Antimicrobial peptides with high proteolytic resistance for combating gram-negative bacteria[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(5): 2286–2304.
- [9] ZHANG R, FAN X, JIANG X, et al. Multiple mechanisms of the synthesized antimicrobial peptide TS against gram-negative bacteria for high efficacy antibacterial action *in vivo*[J]. Molecules, 2020, 26(1): 60.
- [10] NAM J, YUN H, RAJASEKARAN G, et al. Structural and functional assessment of mBjAMP1, an antimicrobial peptide from *Branchiostoma japonicum*, revealed a novel α -hairpinin-like scaffold with membrane permeable and DNA binding activity[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 61(24): 11101–11113.
- [11] SU M, WANG L L, XIANG J H, et al. Adjustment trend of China's marine fishery policy since 2011[J]. Marine Policy, 2021, 124: 104322.
- [12] BOONCHUEN P, SAKHOR H, JAREE P, et al. Shrimp *Vago5* activates an innate immune defense upon bacterial infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 120: 122–132.
- [13] SUN M, LI S, LV X, et al. A lymphoid organ specific anti-lipopolysaccharide factor from *Litopenaeus vannamei* exhibits strong antimicrobial activities[J]. Marine Drugs, 2021, 19(5): 250.
- [14] KANG H K, LEE H H, SEO C H, et al. Antimicrobial and immunomodulatory properties and applications of marine-derived proteins and peptides[J]. Marine Drugs, 2019, 17(6): 350.
- [15] BARBOSA F, PINTO E, KIJOA A, et al. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020, 56(1): 106005.
- [16] SPERSTAD S V, HAUG T, BLENCHE H M, et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(5): 519–530.
- [17] FILIZ E, KURT F. Antimicrobial peptides *Snakin/GASA* gene family in sorghum (*Sorghum bicolor*): Genome-wide identification and bioinformatics analyses[J]. Gene Reports, 2020, 20: 100766.
- [18] YESILTAS B, GREGERSEN S, LÆGSGAARD L, et al. Emulsifier peptides derived from seaweed, methanotrophic bacteria, and potato proteins identified by quantitative proteomics and bioinformatics[J]. Food Chemistry, 2021, 362: 130217.
- [19] HU B, ZHANG J S, JIANG Y R, et al. Quantitative determination of osteopontin in bovine, buffalo, yak, sheep and goat milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and stable isotope dimethyl labeling[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128489.
- [20] YANG S, HUANG H, WANG F, et al. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Amino Acids, 2018, 50(8): 995–1005.
- [21] AGYEI D, TSOPMO A, UDENIGWE C C. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptide[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(15): 3463–3472.
- [22] CLAUDIO D M, RODRIGO R, SERGIO C L, et al. Evaluation of the correlation between minimum inhibitory concentrations (MIC) and disk diffusion data of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from outbreaks occurred in Chilean salmonid farms[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735811.
- [23] KIM H, JANG J H, KIM S C, et al. Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 185: 111814.
- [24] RAJASEKARAN G, DINESH KUMAR S, NAM J, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of chemokine CXCL14-derived antimicrobial peptide and its analogs[J]. Biophysica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 2019, 1861(1): 256–267.
- [25] GENG H J, YUAN Y, ADAYI A, et al. Engineered chimeric peptides with antimicrobial and tita-

- nium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2018, 82: 141-154.
- [26] SAIKIA K, CHAUDHARY N. Interaction of MreB-derived antimicrobial peptides with membranes [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 498(1): 58-63.
- [27] 杨昆, 王欢, 高洁, 等. 抗菌肽 BCp12 对大肠杆菌壁膜及 DNA 损伤的机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 114-121.
- YANG K, WANG H, GAO J, et al. The mechanism of antimicrobial peptide BCp12 on *E. coli* wall membrane and DNA damage[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 114-121.
- [28] YANG S, DONG Y, AWEYA J J, et al. Antimicrobial activity and acting mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin-derived peptide (TGH1) against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104302.
- [29] LUONG H X, THANH T T, TRAN T H. Antimicrobial peptides—advances in development of therapeutic applications [J]. *Life Sciences*, 2020, 260: 118407.
- [30] KWON J Y, KIM M K, MEREUTA L, et al. Mechanism of action of antimicrobial peptide P5 truncations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 122.
- [31] ERGENE C, YASUHARAB K, PALERMO E F. Biomimetic antimicrobial polymers: Recent advances in molecular design[J]. *Polymer Chemistry*, 2018, 9(18): 2407-2427.
- [32] 郭江娜, 史洁, 汪梦瑶, 等. 阳离子聚合物抗菌性能影响因素的研究进展[J]. *南通大学学报(自然科学版)*, 2021, 20(1): 1-13.
- GUO J N, SHI J, WANG M Y, et al. Rresearch progress of influence factor of cationic antimicrobial polymers[J]. *Journal of Nantong University (Natural Science Edition)*, 2021, 20(1): 1-13.
- [33] RICE A, WERESZCZYNSKI J. Probing the disparate effects of arginine and lysine residues on antimicrobial peptide/bilayer association[J]. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, 2017, 1859(10): 1941-1950.
- [34] PANDIT G, CHOWDHURY N, ABDUL MOHID S, et al. Effect of secondary structure and side chain length of hydrophobic amino acid residues on the antimicrobial activity and toxicity of 14-residue-long de novo AMPs[J]. *Chem Med Chem*, 2021, 16(2): 355-367.
- [35] LIU Y, DU Q, MA C, et al. Structure-activity relationship of an antimicrobial peptide, Phylloseptin-PHa: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 447-458.
- [36] 何佳宁, 梁东生, 梁悦娥, 等. 新型抗菌肽 KR-1 的设计、筛选及抗菌活性评价[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(6): 923-930.
- HE J N, LIANG D S, LIANG Y E, et al. Design, screening and antibacterial activity evaluation of the novel antibacterial peptide KR-1 [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2021, 41(6): 923-930.
- [37] 康媛媛, 孟珺, 王艳阳, 等. 抗菌肽功能特性与作用机制的研究进展[J]. *食品科技*, 2021, 46(1): 265-270.
- KANG Y Y, MENG J, WANG Y Y, et al. Research progress on functional characteristics and mechanism of antimicrobial peptides[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(1): 265-270.
- [38] LAI Z H, JIAN Q, LI G Y, et al. Self-assembling peptide dendron nanoparticles with high stability and a multimodal antimicrobial mechanism of action[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(10): 15824-15840.
- [39] SHANG D J, ZHANG Q, DONG W B, et al. The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against gram-negative bacteria and endotoxin neutralization[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 33: 153-165.
- [40] FU L, WAN M, ZHANG S, et al. Polymyxin B loosens lipopolysaccharide bilayer but stiffens phospholipid bilayer[J]. *Biophysical Journal*, 2020, 118(1): 138-150.
- [41] MANDAL H, BAGCHI T. *In vitro* screening of indigenous lactobacillus isolates for selecting organisms with better health-promoting attributes [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185(4): 1060-1074.
- [42] LUO X, YE X, DING L, et al. Identification of the scorpion venom-derived antimicrobial peptide Hp1404 as a new antimicrobial agent against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 157: 104960.

- [43] HOU X, FENG C, LI S, et al. Mechanism of antimicrobial peptide NP-6 from Sichuan pepper seeds against *E. coli* and effects of different environmental factors on its activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6593–6604.
- [44] GU Q Q, HE S W, LIU L H, et al. A teleost bactericidal permeability-increasing protein-derived peptide that possesses a broad antibacterial spectrum and inhibits bacterial infection as well as human colon cancer cells growth[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 118: 103995.
- [45] OMARDIEN S, DRIJFHOUT J W, VAZ F M, et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer[J]. Biophysica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 2018, 1860(11): 2404–2415.
- [46] KLUBTHAWEE N, AUNPAD R. A thermostable, modified cathelicidin-derived peptide with enhanced membrane-active activity against salmonella enterica serovar typhimurium[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 592220.
- [47] YI L, ZENG P, LIU J, et al. Antimicrobial peptide zp37 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts by inflicting damage in cell membrane and binding to DNA[J]. LWT, 2021, 146: 111392.
- [48] LACKRAJ T, BIRSTONAS S, KACORI M, et al. Dps protects enterohemorrhagic *Escherichia coli* against acid-induced antimicrobial peptide killing. Journal of Bacteriology, 2020, 202(11): e00114–20.
- [49] YANG S, LI J, AWEYA J J, et al. Antimicrobial mechanism of *Larimichthys crocea* whey acidic protein-derived peptide (LCWAP) against *Staphylococcus aureus* and its application in milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 335: 108891.
- [50] 苏冠芳, 郝刚, 李莉蓉, 等. 抗菌肽 buforin II 衍生物抑制细菌核酸合成的机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(3): 190–195.
- SU G F, HAO G, LI L R, et al. Antibacterial peptides buforin II analogues on bacteria by inhibition of DNA synthesis[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(3): 190–195.
- [51] VANLOON J, HARROUN T, YAN H. Circular dichroism spectroscopy of DNA duplexes at near-biological concentrations[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021, 43: 128053.
- [52] DAVID M R, SARAH B J, NAOMI T D, et al. Electronic circular dichroism spectroscopy of proteins[J]. Chem, 2019, 5(11): 2751–2774.
- [53] YANG S, HUANG H, AWEYA J J, et al. PvHS9 is a novel in silico predicted antimicrobial peptide derived from hemocyanin of *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2020, 530: 735926.
- [54] MARDIROSSIAN M, PÉRÉBASKINE N, BENINCASA M, et al. The dolphin proline-rich antimicrobial peptide Tur1A inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome[J]. Cell Chemical Biology, 2018, 25(5): 530–539.
- [55] PAZDERKOVÁ M, MALOŇ P, ZÍMA V, et al. Interaction of halictine-related antimicrobial peptides with membrane models[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 631.
- [56] ZHU Y Y, WEISSHAAR J C, MUSTAFI M. Long-term effects of the proline-rich antimicrobial peptide Oncocin112 on the *Escherichia coli* translation machinery[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(38): 12314–12325.
- [57] TANIGUCHI M, OCHIAI A, KONDO H, et al. Pyrrhocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(5): 591–598.
- [58] SADLER K, EOM K D, YANG J L, et al. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7[J]. Biochemistry, 2002, 41(48): 14150–14157.
- [59] LV M, WANG M, LU K, et al. DNA/Lysozyme-binding affinity study of novel peptides from TAT (47–57) and BRCA1 (782–786) *in vitro* by spectroscopic analysis[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 209: 109–117.
- [60] SATISH L, SANTRA S, TSURKAN M V, et al. Conformational changes of GDNF-derived peptide induced by heparin, heparan sulfate, and sulfated hyaluronic acid—analysis by circular dichroism spectroscopy and molecular dynamics simulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules,

- 2021, 182: 2144–2150.
- [61] CONTINI A, ERBA E, BONDAVALLI V, et al. Morpholino-based peptide oligomers: Synthesis and DNA binding properties [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 549: 8–13.
- [62] LIU H F, ZHANG H Y, WANG Q, et al. Mechanisms underlying the antimicrobial actions of the antimicrobial peptides Asp-Tyr-Asp-Asp and Asp-Asp-Asp-Tyr[J]. *Food Research International*, 2021, 139: 109848.
- [63] FENSTERSEIFER I C M, FELÍCIO M R, ALVES E S F, et al. Selective antibacterial activity of the cationic peptide PaDBS1R6 against gram-negative bacteria[J]. *Biophysica et Biopgysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2019, 1861(7): 1375–1387.
- [64] DAL MAS C, PINHEIRO D A, CAMPEIRO J D, et al. Biophysical and biological properties of small linear peptides derived from crotamine, a cationic antimicrobial/antitumoral toxin with cell penetrating and cargo delivery abilities[J]. *Biophysica et Biopgysica Acta (BBA) –Biomembranes*, 2017, 1859 (12): 2340–2349.
- [65] LAN Y, YE Y, KOZLOWSKA J, et al. Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides[J]. *Biophysica et Biopgysica Acta (BBA) –Biomembranes*, 2010, 1798 (10): 1934–1943.

Antimicrobial Peptides Screened from *Penaeus vannamei* Shrimp and Investigation of Their DNA Binding Mechanism

Wang Mingyao¹, Zheng Mingjing^{1,2,3}, Ren Zhongyang^{1,2,3}, Shi Linfan^{1,2,3}, Deng Shanggui⁴, Yang Shen^{1,2,3*}

¹College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian

²Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian

³Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

⁴Zhejiang Xingye Group Co., Ltd., Zhoushan 316014, Zhejiang)

Abstract The antimicrobial activity and DNA binding mechanism of a novel antimicrobial peptide (AMP) PV13 against *Vibrio parahaemolyticus* from *Penaeus vannamei* were explored. The sequence of the peptides were identified by using ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, and the cationic antimicrobial peptide PV13 (ALPWVLPWALPRALPRVLPR) was screened by using in silico tools. The antimicrobial activity of AMP PV13 against *V. parahaemolyticus* was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and time-kill curve, the MIC of PV13 was 62.5 µg/mL and killed *V. parahaemolyticus* within 2 h. The antibacterial mechanism of PV13 against *V. parahaemolyticus* was evaluated using transmission electron microscopy (TEM), intracellular membrane permeability, DNA gel retardation and circular dichroism. The results shows that PV13 increases bacterial cell membrane permeability and binds bacteria genomic DNA concentration dependently. Moreover, AMP PV13 exhibited a random coil structure in PBS and SDS solutions, while its structure changed significantly after binding with DNA of *V. parahaemolyticus*. The antimicrobial activity of peptide PV13 could be due to the presence of four leucine-proline repeat regions. The above results provide new insight into screening and designing AMPs from *P. vannamei*, and offer a theoretical basis of AMP PV13 for their potential applications in food preservation.

Keywords *Penaeus vannamei*; *Vibrio parahaemolyticus*; antimicrobial peptide; antimicrobial activity; DNA binding mechanism