

植物乳植杆菌 LP315 抗菌肽的筛选及作用机制

王 潇, 陈永福, 扎木苏*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 乳酸菌是抗菌肽的重要来源。本研究旨在从植物乳植杆菌 LP315 发酵上清液来源的肽段中筛选具有良好抑菌活性的抗菌肽,并对其抑菌特性及作用机制进行分析。方法:首先使用在线软件 CAMPR3、APD3 和 ProtParam 对抗菌肽进行虚拟筛选,并通过 ADMET 预测评估其安全性。之后,使用固相合成方法合成候选肽。通过 MIC、时间杀伤曲线、蛋白酶处理试验对其抑菌特性进行分析。通过扫描电子显微镜 (SEM) 以及分子对接试验对其作用机制进行研究。结果表明,PLN-1 (TELAKKLLVK)和 PLN-2(VVSGHRINGKNQLLISAGLK)经预测具有良好的抑菌活性,且 ADMET 评分表明其安全可靠。肽段 PLN-1 和 PLN-2 经固相合成后检验其抑菌活性,结果发现 PLN-1 对金黄色葡萄球菌有抑制作用, MIC 为 5.47 mmol/L。PLN-2 对大肠杆菌有抑制作用, MIC 为 2.97 mmol/L,其抑菌活性均呈浓度和时间依赖性。经部分蛋白酶处理后抗菌肽的抑菌活性丧失,表明发挥抑菌作用的物质为抗菌肽。通过 SEM 观察到 2 种肽均对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的细胞结构产生破坏。分子对接验证 2 个抗菌肽可能通过氢键与疏水作用分别与金黄色葡萄球菌的肽聚糖糖基转移酶/转肽酶和大肠杆菌的脂多糖结合,从而破坏细胞完整性,发挥抑菌作用。

关键词 抗菌肽筛选; MIC; SEM; 分子对接

文章编号 1009-7848(2025)02-0092-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.008

目前全球每年约有 6 亿例食源性疾病发生,导致 42 万人的死亡,这几乎相当于全世界每年因道路交通事故死亡人数 (135 万人) 的 31.1%,并且,由细菌引起的食源性疾病比由病毒和寄生虫引起的食源性疾病更为常见^[1]。其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 均属于常见的食源性致病菌。致病性大肠杆菌具有许多毒力策略,除肠入侵性大肠杆菌外,所有病原体是通过菌毛或鞭毛与宿主细胞黏附,之后产生分泌蛋白破坏宿主细胞的正常生命进程^[2]。金黄色葡萄球菌可产生多种胞外蛋白,将宿主局部组织转化为细菌生长所需的营养物质,并产生葡萄球菌肠毒素、剥脱性毒素和杀白细胞素等,攻击宿主的免疫系统,使其定植于哺乳动物宿主中并引起疾病^[3]。

亚硝酸盐和二氧化硫等化学防腐剂,可延缓甚至阻止微生物的生长,防止食品变质,目前被广泛应用于食品保存。然而,越来越多的研究证实,长期使用化学防腐剂可能对人体健康产生负面影

响,近些年消费者也更倾向于选择不含化学添加剂的“天然食品”^[4]。同时,抗生素耐药性问题日渐严峻,使食源性疾病的治疗面对巨大挑战。随着细菌的不断进化,需要新的方法来管理感染,例如开发具有抗耐药病原体活性的新型抗生素、免疫调节剂、疫苗、抗毒剂或其它生物制剂^[5]。这促使研究人员寻找有效的天然抗菌剂替代化学防腐剂及抗生素,以提高产品质量和安全性,并防治食源性疾病。

抗菌肽 (Antimicrobial peptide, AMP) 具有广谱抗菌活性和多方面的作用机制,对微生物生长有显著的抑制作用,是后抗生素时代一种很有前途的抗生素代替品。抗菌肽无色、无臭、无味,不影响食物的感官,且可被人体消化系统分解,因此被认为是安全的食品添加剂^[6]。抗菌肽的应用可降低对化学防腐剂的需求。

抗菌肽来源广泛,已在自然界中哺乳动物、昆虫、两栖动物、鱼类、植物等多种生物体中得到鉴定与分离。其中,微生物来源的抗菌肽与其它生物体来源的抗菌肽不同,微生物能够分泌多种免疫调节分子,使其能够在火山口、沙漠等极端环境中生存,因此更容易分离出结构新颖、性能优越的抗菌肽,丰富现有的抗菌肽资源库^[7]。早期抗菌肽的

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31901666)

第一作者: 王潇,女,硕士生

通信作者: 扎木苏 E-mail: mszha1988@163.com

发现依赖于从天然来源中分离,通常需要大量的原始生物材料,而只能提取少量的纯肽,近年来生物信息学的应用优化了这一进程^[8]。

植物乳植杆菌 LP315 (*Lactiplantibacillus plantarum* LP315) 在之前的研究中被发现具有产抗菌肽的潜力,并且通过 LC-MS 方法鉴定出半纯化上清液中抑菌相关的肽段^[9]。本研究进一步通过生物信息学预测、筛选有良好抑菌活性的肽段,并通过 ADMET 预测评价其安全性。通过固相合成筛选得到的肽段,验证其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌特性。通过扫描电子显微镜 (SEM) 和分子对接的方法探究其抑菌机制。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

植物乳植杆菌 LP315、大肠杆菌 (CI-CC23657)、金黄色葡萄球菌 (ATCC12600) 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室保藏。

1.2 材料与试剂

主要材料及试剂包括:MRS 肉汤培养基,英国 OXOID 公司;NB 肉汤、BHI 培养基,广东环凯微生物科技有限公司;2.5%戊二醇固定液,上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K, 上海源叶生物科技有限公司;0.22 μm 滤器,鲁尔过滤有限公司;抗菌肽由合肥科生景肽生物科技有限公司合成,纯度 95% 以上。

1.3 仪器与设备

SW-CJ-2FD 超净工作台,苏州安泰空气净化有限公司;5810R 高速冷冻离心机,德国艾本德股份有限公司;MLS-3751L 全自动高压灭菌锅,日本三洋株式会社;LRH-250 电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;HH-21-6 电热恒温水浴锅,天津知春科技有限公司;SpectraMax 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 分子仪器公司。

1.4 抗菌肽的筛选与安全评价

1.4.1 生物信息学筛选 使用在线软件 CAMPR3 (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/prediction.php>) 预测肽段的抑菌活性;肽段的理化性质包括净电荷数、GRAVY 总平均亲水性和 Wimley-White 全残基疏水性标度、蛋白结合势 (Boman index) 使用在

线软件 APD3 (<https://aps.unmc.edu/AP/>) 进行计算;等电点使用 ProtParam 在 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 中预测。结合 CAMPR3 预测和肽段的理化性质,筛选出预测具有良好抑菌活性的肽段。

1.4.2 抗菌肽的 ADMET 预测评分 将筛选出的肽段进行 ADMET 评分,评分包括肽段的吸收 (Absorption)、分布 (Distribution)、代谢 (Metabolism)、排泄 (Excretion) 和毒性 (Toxicity) 特性。首先通过基于网络的工具 PepSMI (<https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>) 获得了先前鉴定的 2 种抗菌肽的 SMILES 结构式。随后将 SMILES 结构式输入 ADMETlab 平台 (<https://admetmesh.scbdd.com/>), 评估涉及人体肠道吸收、诱变性、致癌性、中枢神经系统渗透性、药物性肝损伤、细胞色素 P450 酶抑制、清除率、半衰期和皮肤致敏等关键参数的吸收、分布、代谢、排泄和毒性特征。通过 ADMET 预测的肽段采用固相合成法 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS), 由合肥科生景肽生物科技有限公司提供合成,冻干保存。

1.5 抗菌肽的抑菌活性分析

1.5.1 最低抑菌浓度 (MIC) 将指示菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌活化传至第 2 代,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h 至对数生长期,使用磷酸缓冲液 (PBS) 将指示菌浓度调整至 $1 \times 10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。取抗菌肽样品 25 mg 溶解与 1 mL PBS 中,过 0.22 μm 滤膜除菌,将其梯度稀释,分别与等体积菌悬液混合,使抗菌肽终质量浓度为 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 mg/mL。空白对照为 PBS 与等体积菌悬液混合。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h 使抗菌肽充分发挥作用后,取 30 μL 反应液进行涂布,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 14 h^[10]。

1.5.2 时间杀伤曲线 同 1.5.1 培养指示菌。将指示菌悬液与不同质量浓度抗菌肽溶液按体积比 1:1 混合,使抗菌肽终浓度为 0 MIC、0.5 MIC、1 MIC、0 MIC 作为空白对照。在 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h 时取样,使用平板倾注法活菌计数。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后统计活菌数,绘制抗菌肽对指示菌的时间杀伤曲线^[10]。

1.5.3 蛋白酶处理 同 1.5.1 节方法培养指示菌。分别称取终质量浓度 2 mg/mL 胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 k, 与终浓度 1 MIC 的

PLN-1 和 PLN-2 充分混合;同时浓度为 1 MIC 而未经蛋白酶处理的 PLN-1 和 PLN-2 作为酶处理试验组的对照组。37 °C 孵育 5 h 使其充分反应。之后将样品与等体积菌悬液混合处理 2 h,通过平板倾注法活菌计数验证其抑菌效果,37 °C 培养 24 h 后统计活菌数^[11]。

1.6 抗菌肽的抑菌机制探究

1.6.1 扫描电子显微镜 将指示菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别培养至对数生长期,4 000 r/min 低速离心 5 min 收集绿豆大小菌泥,使用 PBS 清洗菌泥 3 次,以清除菌体表面附着的杂质。以 1 MIC 浓度的 PLN-1 与 PLN-1 分别处理的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为试验组,以 1 MIC 浓度的 PLN-1 与 PLN-2 分别处理的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为试验对照组,使用等体积 PBS 处理指示菌为空白组。将指示菌与处理液充分混合,于 37 °C 孵育 2 h,之后低速离心 (4 000 r/min, 5 min) 吸弃上清,保留菌泥沉淀。继续加入 2.5% 戊二醛电镜固定液室温固定 2 h,然后置于 4 °C 过夜固定,接着用乙醇脱水 15 min,进行充分干燥后,在 IB-3 型离子镀膜仪上对菌体细胞进行喷金镀膜,通过 SEM (Hitachi SU8100) 对样品进行观察^[12]。

1.6.2 分子对接

1.6.2.1 抗菌肽三维结构预测 使用 PEP-FOLD (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) 与 I-TASSER 在线网站 (<https://zhanglab.dcm.med.umich.edu/I-TASSER/>) 预测抗菌肽的三维结构。选择预测排名最优的模型,通过 ProSA 工具 (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) 预测查询蛋白 z-score 评分,ProSA z-score 是将被查询的结构与 PDB 库中经过实验验证的结构进行对比评价;z-score 值越高,表明相似性越高^[13-14]。随后,使用 pymol 绘制 PDB 文件格式的拉式图 (Ramachandran plot),对模拟抗菌肽结构的立体化学性质进行了估计。拉式图以一种易于理解的方式显示给定蛋白质或多肽结构中主链氨基酸残基二面角 ψ 和 φ 的可视化;在理论偏好区有大部分残基,而在不允许区域没有残基或残基很少 (<3%) 的模型被认为是质量好的模型^[15]。

1.6.2.2 抗菌肽与关键蛋白的分子对接 分子对

接研究用于研究多肽与指示菌关键结构蛋白之间的相互作用。金黄色葡萄球菌肽聚糖糖基转移酶/转肽酶 (Identification of dynamic structural motifs involved in peptidoglycan glycosyltransfer) 和大肠杆菌外膜脂多糖 (Crystal structure of the lipopolysaccharide assembly complex LptD-LptE from the *Escherichia coli* outer membrane) 的 X 衍射晶体结构,从结构生物学研究合作实验室 (RCSB) 蛋白质数据库 (PDB) 中获得,PDB 代码分别为 3DWK 和 4RHB。PLN-1 和 PLN-2 选择 PEP-FOLD 平台预测的 PDB 结构,作为配体,指示菌蛋白结构作为受体。使用 Pymol v2.6.0 对受体分子进行前处理去除配体和水分,使用 AutoDock Vina v1.1.2 定位结合区并进行分子对接,选择对接 50 次,根据所有对接结果的最小能量得分,选出结合能最低的最佳构象进行分析。对接结果通过 Pymol V2.6.0 进行 3D 可视化分析,同时通过 LigPlot+ v2.2.4 进行 2D 可视化分析^[16]。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽的筛选与安全评价

2.1.1 生物信息学筛选 序列组成是决定肽段是否具有抑菌活性的重要因素,肽段序列的微小变化可以显著改变其抗菌活性。在抗菌肽数据库中观察到大多数的抗菌肽长度在 10 到 50 个氨基酸之间,带正电荷,伯曼指数 (Boman index) 在 (0~8.363 kJ/mol) 之间,30%~50% 的初级结构由疏水残基组成,它们的 pI 通常处于碱性^[17]。

定量构效关系 (Quantitative structure-activity relationship, QSAR) 建模是一种用于推断结构与活性之间关系的方法。这种方法利用了机器学习算法,使用统计方法学习和提取一些重要的特征进行预测分析新分子的性质。CAMPR3 在线网站是一个包含原核生物和真核生物抗菌肽序列、结构和家族特异性特征 (Family-specific signatures) 的数据库,CAMPR3 通过数据库检索和对抗菌肽家族特征检索,预测肽段序列是否具有有抑菌性^[18]。CAMPR3 判定 >0.5 的序列具有潜在抑菌活性,预测结果如表 1 所示。

此外,还可以整体上根据肽的分子质量、净电荷、疏水性 (GRAVY、Wimley-White) 和 Boman in-

dex 等特性,预测肽的抑菌潜力^[19]。具有阳离子特性的肽将与致病菌的细胞膜产生静电相互作用,从而产生抑菌活性^[20]。同时,亲脂性(疏水性)更强的肽更利于同细胞膜结合,从而对致病菌发挥抑菌作用^[21]。肽的疏水性可通过 GRAVY 总平均亲水性和 Wimley-White 全残基疏水性标度来衡量。GRAVY 指数衡量肽的溶解度,正的 GRAVY 值表示蛋白质具有疏水性^[22]。Wimley-White 是通过试验测定建立的标度,该参数表示与肽从水环境重新分配到疏水环境需要的自由能^[23]。高 Boman index(10.46~12.55 kJ/mol)表明抗菌肽在细胞内具

有多功能,因为它能够与多种蛋白质相互作用,而指数值越低(≤ 1),表明抗菌肽副作用越小(如溶血活性较低),仅具有单一抗菌作用的可能性大^[24-25]。

通过上述指标,筛选出 PLN-1(TELAKKL-LVK)、PLN-2(VVSGHRINGKNQLLISAGLK)2 条肽段,CAMPR3 分数均 >0.5 预测具有抑菌活性;净电荷数 >2 ,GRAVY 指数 >0 ,Wimley-White 标度在 2~4 之间,表明其均属于阳离子疏水性肽;Boman index 在 0~1 范围;pI 为碱性。

表 1 肽段理化性质及抑菌活性的预测

Table 1 Prediction of physicochemical properties and bacteriostatic activity of peptides

ID	肽段序列	CAMPR3	净电荷数	GRAVY	Wimley-White	Boman index/(kJ/mol)	pI 值
PLN-1	TELAKKLLVK	0.89	+2.00	0.15	3.69	2.26	9.70
PLN-2	VVSGHRINGKNQLLISAGLK	0.77	+3.25	0.09	2.68	3.92	11.17
PLN-3	KNYSKTWWYKSLTLLGK	0.84	+4.00	-0.91	-2.33	5.06	10.00
PLN-4	GLQVPHAFTKLLKALGGHH	0.69	+ 2.75	0.07	0.73	0.00	10.00
PLN-5	SLMSGLQVPHAFTKLLKALGGHH	0.25	+ 2.75	0.24	0.2	-0.04	10.00
PLN-6	AVGPADWVISAVRGIHG	0.82	+ 0.25	0.78	-0.06	-0.88	6.79
PLN-7	FNRGGYNFGKSVRHVVDAIG	0.74	+ 2.25	-0.29	1.89	7.74	9.99
PLN-8	ILLQLRLGILA	0.92	+1.00	2.16	-2.16	-7.53	9.75
PLN-9	LTAGLIVG	0.69	0.00	2.08	-1.03	-10.42	5.52
PLN-10	HVDIHHYSSNQAK	0.27	+0.75	1.26	2.98	11.76	7.02
PLN-11	LGDQLVSQQTITATITTSSTSQQGQPGGG TPSGNTGGSK	0.15	0.00	-0.94	8.4	8.24	5.84
PLN-12	LTIGVGFILSGWKGRVDL	0.69	+1.00	0.75	-1.78	-1.76	8.75
PLN-13	GVFLNRLDAKWRLDSDISVFYA	0.23	0.00	0.11	0.43	6.53	6.04

2.1.2 抗菌肽的 ADMET 预测评分 ADMETlab 平台分析是基于 PubChem、OCHEM、DrugBank、ChEMBL 数据库、美国环境保护署(EPA)开发的毒性评估软件工具(TEST),以及同行评审文献,组成的 25 万条高质量数据条目的综合数据库^[26]。表 2 为 PLN-1、PLN-2 基于 ADMETlab 平台获得的 ADMET 评分。

当抗菌肽进入人体后,其吸收程度和渗透性是很重要的药代动力学参数。人体肠道吸收(Human intestinal absorption positive, HIA+)和 Caco-2 渗透性是影响生物利用度的关键,用于评估化合物在人体肠道中的吸收程度和渗透性^[27]。2 种

多肽的 HIA 值在 0.9 以上,Caco-2 渗透性高于 5.15,均呈阳性,表明 2 种肽很容易被人体肠道吸收。

分布特性通过容积分布(VD)、血浆蛋白结合率(PPB)和血脑屏障(BBB)渗透来预测。药物的 PPB 水平可以影响药物的作用、处置和疗效,PPB 评分低表示分布量大,分布量大的化合物通常具有较短的血浆半衰期^[28]。2 个肽段血浆蛋白均结合良好(PPB $<90\%$)。另一方面,血脑屏障穿透率(BBB)指标体现化合物通过血脑屏障的能力,BBB 大于或等于 0.3 的化合物可以穿过血脑屏障,并可能引起中枢神经系统毒性,2 种抗菌肽均无法穿过

血脑屏障(BBB<0.1)。

细胞色素 P450 酶(CYP1A2 和 CYP3A4)具有降解保护作用,参与内、外源化合物的代谢,以及用于控制发育和体内平衡的关键信号分子的生物合成。在哺乳动物组织中,p450 酶分别通过药物和异种生物的代谢、类固醇激素的合成、脂溶性维生素的代谢,以及多不饱和脂肪酸向生物活性分子的转化,来发挥这些作用^[29]。2 种肽均不抑制任何细胞色素 P450 酶,并且都表现出低清除率和短半衰期。

hERG (Human EtheR-a-go-go gene)是一种编码蛋白质 Kv11.1 的基因,该蛋白质是钾离子通道的 α 亚基,hERG 对于维持正常的心脏电活动必不可少,如果抑制剂阻断 hERG 可导致心脏骤停的风险增加^[27]。2 种肽均不属于 hERG 通道抑制剂(hERG blockers<0.5)。此外,2 种肽均为药物性肝损伤阴性,无致癌性,非诱变性和非皮肤敏感性,表示其无人体毒性风险(表 2)。因此,基于上述参数,表明 ADMET 谱评估筛选出的两条抗菌肽均是安全可靠的。

表 2 抗菌肽的 ADMET 预测评分

Table 2 ADMET prediction scores for antimicrobial peptides PLN-1 and PLN-2

属性	项目	PLN-1	PLN-2	评估
吸收	人体肠道吸收 (Human intestinal absorption, HIA)/%	0.994	0.909	HIA >0.3: HIA 阳性; HIA <0.3: HIA 阴性
	Caco-2 渗透性 (Caco-2 permeability, Papp)/(cm/s)	-8.189	-6.716	最优范围: > -5.15
分布	容积分布 (Volume distribution, VD)/(L/kg)	0.538	0.233	最优范围: 0.04~20
	血脑屏障穿透率 (Blood brain barrier penetration, BBB)/%	1.80	2.30	BBB \geq 10%: BBB 阳性, BBB <10%: BBB 阴性
	血浆蛋白结合率 (Plasma protein binding, PPB)/%	27.70	25.77	PPB <90%: 最优范围; PB >90%: 低治疗指数
新陈代谢	CYP1A2-抑制剂 (CYP1A2-inhibitor)	0.000	0.000	>0.5: 抑制剂; <0.5: 非抑制剂
	CYP1A2-底物 (CYP1A2-substrate)	0.000	0.000	>0.5: 抑制剂; <0.5: 非抑制剂
	CYP3A4-抑制剂 (CYP3A4-inhibitor)	0.015	0.002	>0.5: 抑制剂; <0.5: 非抑制剂
	CYP3A4-底物 (CYP3A4-substrate)	0.006	0.002	>0.5: 抑制剂; <0.5: 非抑制剂
清除	清除率 (Clearance, CL)/(mL·kg/min)	0.705	-0.119	高: >15; 中等: 5 - 15; 低: <5
	半衰期 (Half-life, T1/2)/h	0.910	0.862	半衰期长: >3 h; 半衰期短: <3 h
毒性	hERG 通道抑制剂 (hERG blockers)	0.005	0.000	>0.5: 阻滞剂; <0.5: 非阻滞剂
	药物性肝损伤 (Drug induced liver injury, DILI)	0.001	0.000	>0.5: 肝毒性; <0.5: 非肝毒性
	诱变性 (Ames mutagenicity, AMES)	0.003	0.005	>0.5: 阳性; <0.5: 阴性
	致癌性 (Carcinogenicity)	0.046	0.048	>0.5: 致癌; <0.5: 非致癌
	皮肤致敏 (Skin sensitization)	0.285	0.102	>0.5: 致敏; <0.5: 非致敏

2.2 抗菌肽的抑菌活性分析

2.2.1 MIC 与时间杀伤曲线 PLN-1 和 PLN-2 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性如图 1、图 2 所示。结果表明,PLN-1 浓度为 2.74 mmol/L 和 5.47 mmol/L 处理 2 h 后,金黄色葡萄球菌活菌数分别减少 11%和 100%(图 1a~1e),而对大肠杆菌无抑菌活性(图 1f~1j)。而 PLN-2 浓度为 1.49 mmol/L 和 2.97 mmol/L 时,大肠杆菌活菌数

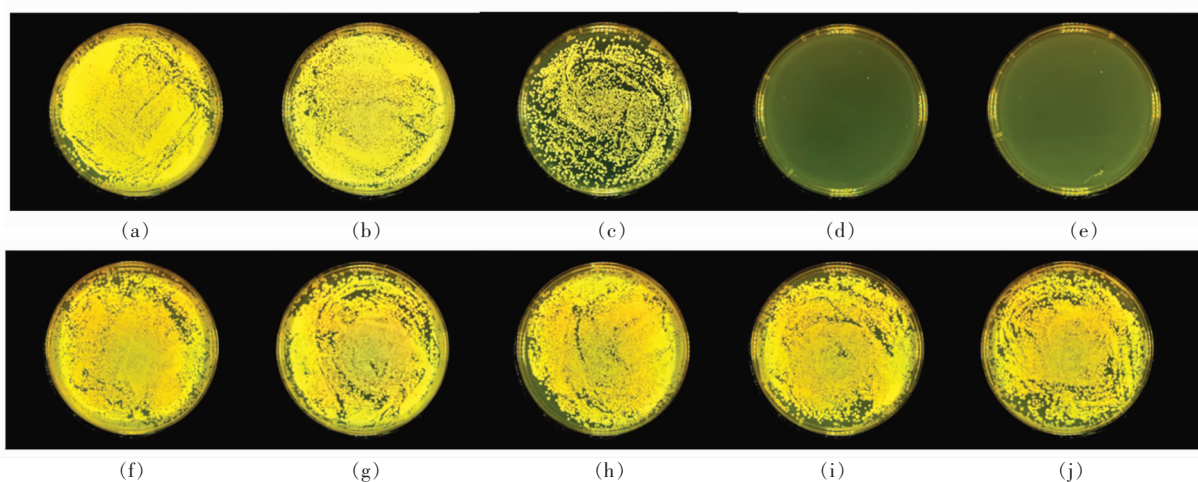
分别减少 33%和 100%(图 2a~2e),而 PLN-2 对金黄色葡萄球菌无抑菌活性(图 2f~2j)。其 MIC 分别为 5.47 mmol/L 和 2.97 mmol/L。此外,如图 3 抗菌肽对指示菌的时间杀伤曲线所示,PLN-1 和 PLN-2 分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有浓度依赖性的抑菌活性,同时抑菌效果随着处理时间的延长而增强。PLN-2 的 MIC 浓度低于 PLN-1,并且 1 MIC 处理 0.5 h 时可将全部指示菌杀死,因

此相对于 PLN-1 具有更强且更迅速的抑菌作用。

PLN-1 对革兰氏阳性菌具有抑菌活性, 对革兰氏阴性菌无抑菌活性, 而 PLN-2 反之。推测原因为 2 种指示菌的细胞结构具有很大差异, 革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖结构较厚使得部分抗菌肽难以穿过, 而革兰氏阴性菌虽然肽聚糖层较薄, 但具有外膜结构防御抗菌肽^[30]。后续在抗菌肽的抑菌机制部分将做进一步探究。

2.2.2 酶处理验证抑菌活性物质 为了排除杂质

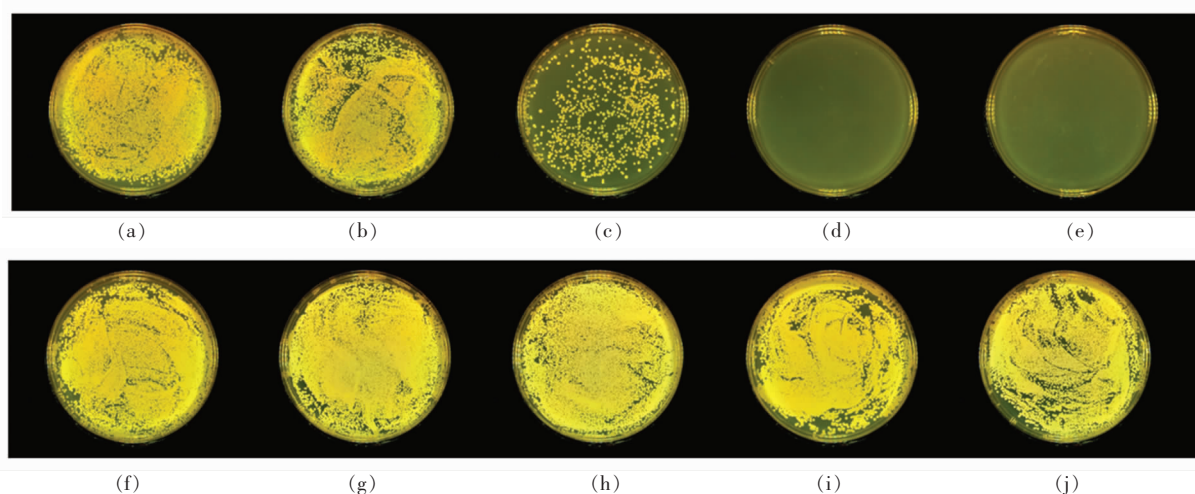
等因素的影响, 确定是否是抗菌肽发挥的抑菌作用, 对抗菌肽进行蛋白酶处理后, 再检验其抑菌能力。如图 4 所示, 对照组为指示菌加 1 MIC 抗菌肽处理, 空白组为指示菌加等量的 PBS 处理, 其余试验组为指示菌加被蛋白酶处理后的抗菌肽。试验结果中指示菌的活菌数越高, 说明样品的抑菌活性越差。PLN-1 在经过胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 处理后, 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性均有不同程度降低, 其中木瓜蛋白酶



注: 图 a~e 指示菌为金黄色葡萄球菌, 图 f~j 指示菌为大肠杆菌, 菌株浓度均为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL, 图 a~e 与图 f~j 的 PLN-1 浓度分别为 0, 1.37, 2.74, 5.47, 10.95 mmol/L。

图 1 PLN-1 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用

Fig.1 Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by PLN-1



注: 图 a~e 指示菌为大肠杆菌, 图 f~j 指示菌为金黄色葡萄球菌, 浓度均为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL, 图 a~e 与 f~j PLN-2 浓度分别为 0, 0.76, 1.49, 2.97, 5.94 mmol/L。

图 2 PLN-2 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用

Fig.2 Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by PLN-2

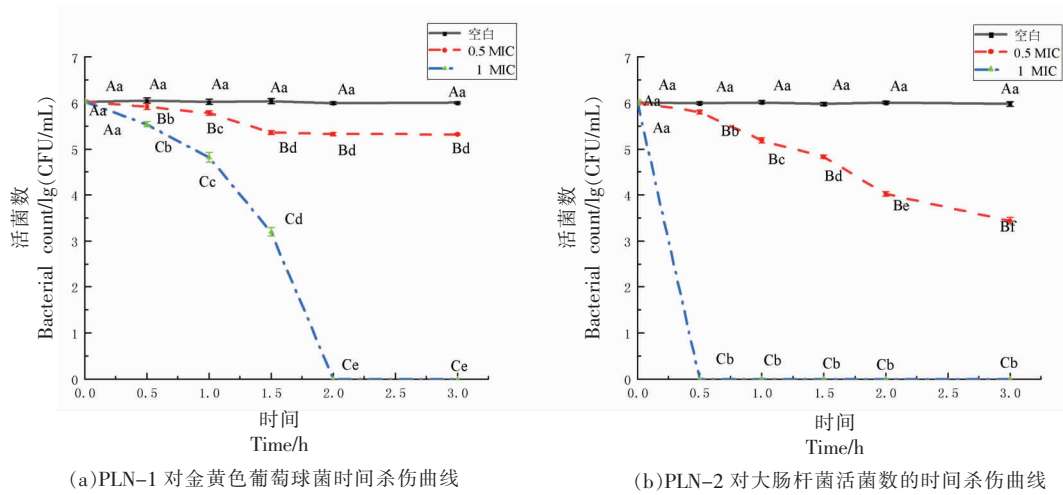
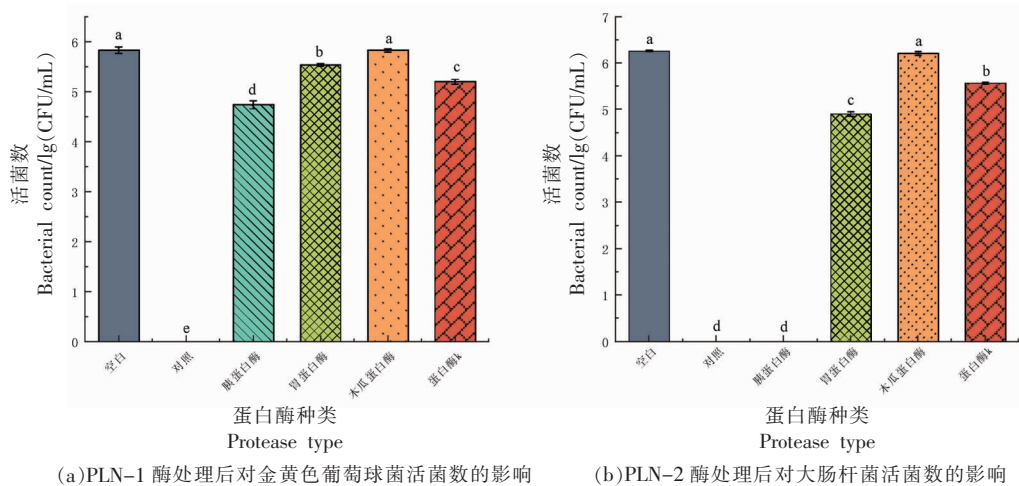


图 3 抗菌肽对指示菌的时间杀伤曲线

Fig.3 Time-killing curves of antimicrobial peptides against indicator bacteria

可以使 PLN-1 活性完全丧失。PLN-2 被胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 处理后活性降低,其中木瓜蛋白酶使其活性完全丧失,而胰蛋白酶处理没有影响 PLN-2 的活性。酶处理试验表明产生抑

菌活性的物质为抗菌肽,并且这种对蛋白酶的敏感性可以防止抗菌肽在体内积累,提高其安全性^[31]。



注:图中不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

图 4 蛋白酶处理后的抗菌肽对指示菌的抑菌活性

Fig.4 Inhibitory activity of protease-treated antimicrobial peptides against indicator bacteria

2.3 抗菌肽的抑菌机制探究

2.3.1 扫描电子显微镜 根据 2.2 节试验结果,抗菌肽 PLN-1 和 PLN-2 分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有抑菌活性,因此通过 SEM 观察指示菌微观结构的变化,以探究 PLN-1 和 PLN-2 分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的体外作用机制。图 5a、5c 为未经抗菌肽处理和经过 PLN-2 处

理的金黄色葡萄球菌,可以观察到菌体具有完整的球形细胞形状,细胞壁表面光滑,边缘清晰。经过 PLN-1 处理后的金黄色葡萄球菌如图 5b 所示,金黄色葡萄球菌表面出现褶皱凹陷,细胞失去正常细胞形态,部分菌体的细胞壁发生破损。对于大肠杆菌,图 5d 为未经抗菌肽处理的正常大肠杆菌,细胞形态呈饱满的杆状,可以观察到细胞壁表

面完整清晰的纹理结构。同时,使用 PLN-1 处理后菌体形态(图 5f)与大肠杆菌正常形态(图 5d)相同。经过 PLN-2 处理的大肠杆菌(图 5e),菌体边缘模糊并且菌体之间发生黏连,细胞壁细胞膜明显发生破损甚至崩解,伴有细胞内容的流失导致菌体不复饱满。通过 SEM 可以观察到 PLN-1

和 PLN-2 分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌体的表面结构产生破坏。推测 PLN-1 和 PLN-2 的抑菌机制类似于短抗菌肽(SLAP)-S25^[32],通过破坏指示菌的细胞壁细胞膜结构,导致细胞内容物渗漏,从而达到杀菌效果。

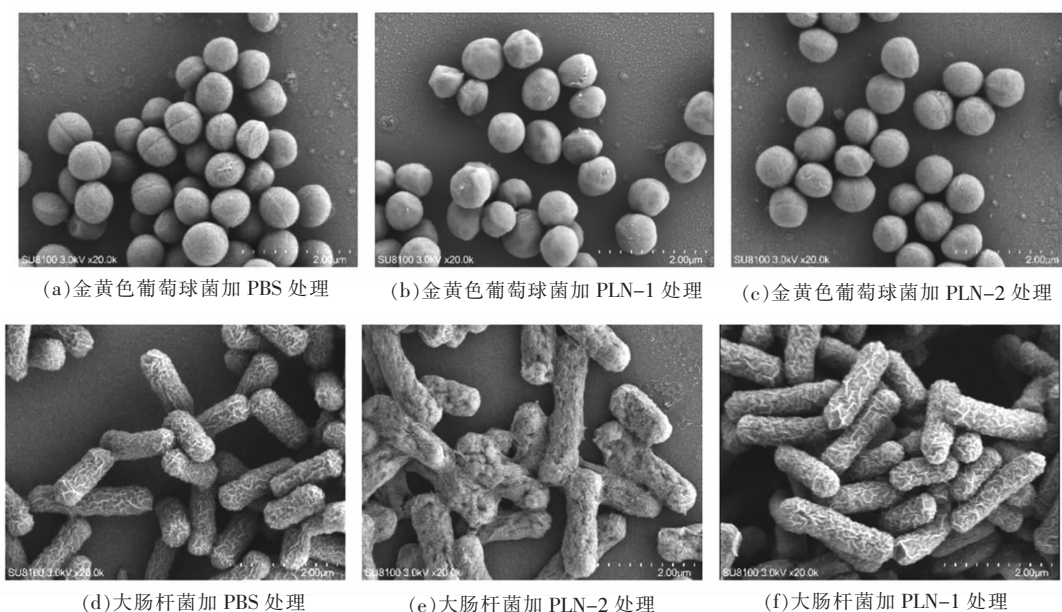


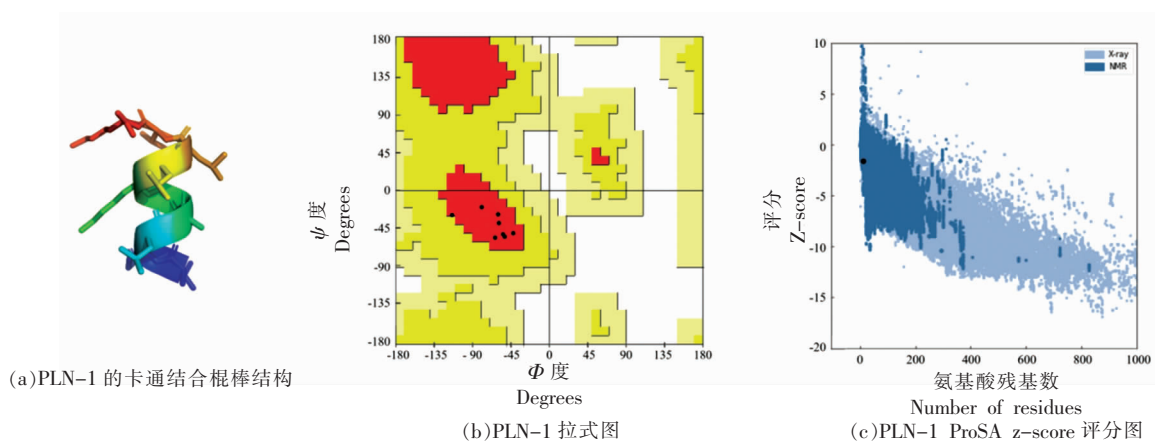
图 5 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 SEM 图(20 000×)

Fig.5 SEM of *S. aureus* and *E. coil* (20 000×)

2.3.2 分子对接

2.3.2.1 抗菌肽三维结构预测 使用 PEP-FOLD 和 I-TASSER 预测 PLN-1 的三维结构,结果如图 6a、7a 所示,分别对结构的 PDB 文件进行 Ramchndran plot 预测和 ProSA 验证,结果如图 6b、6c、7b、7c 所示。PLN-1 由 PEP-FOLD 网站预测模型

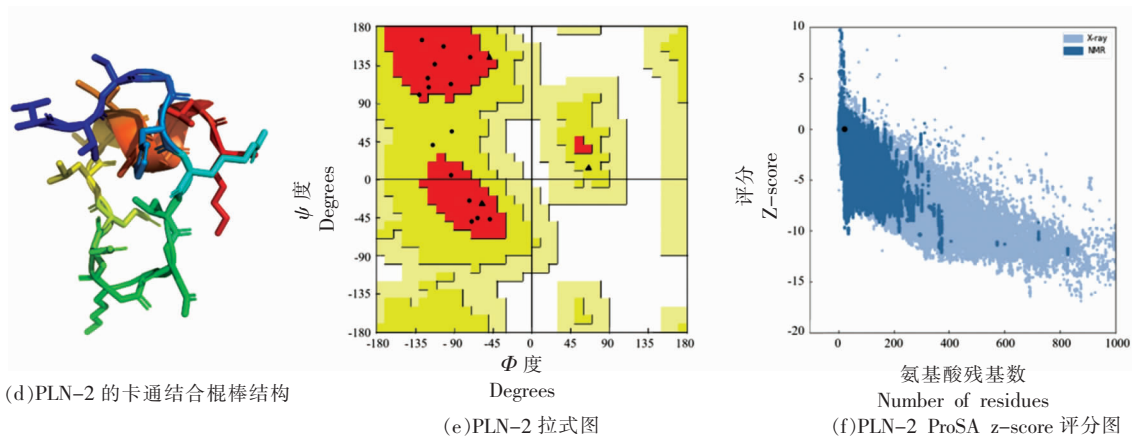
的拉式图有 83.33%氨基酸残基落在理论偏好区,而由 I-TASSER 网站预测的三维结构在理论偏好区仅具有 50%的氨基酸残基,并且 PEP-FOLD 网站预测结构比 I-TASSER 网站预测结构的 z-Score 评分更高。因此 PEP-FOLD 网站对 PLN-1 三维结构的预测更为准确。如图 6d 与图 7d 所示,



(a)PLN-1 的卡通结合棍棒结构

(b)PLN-1 拉式图

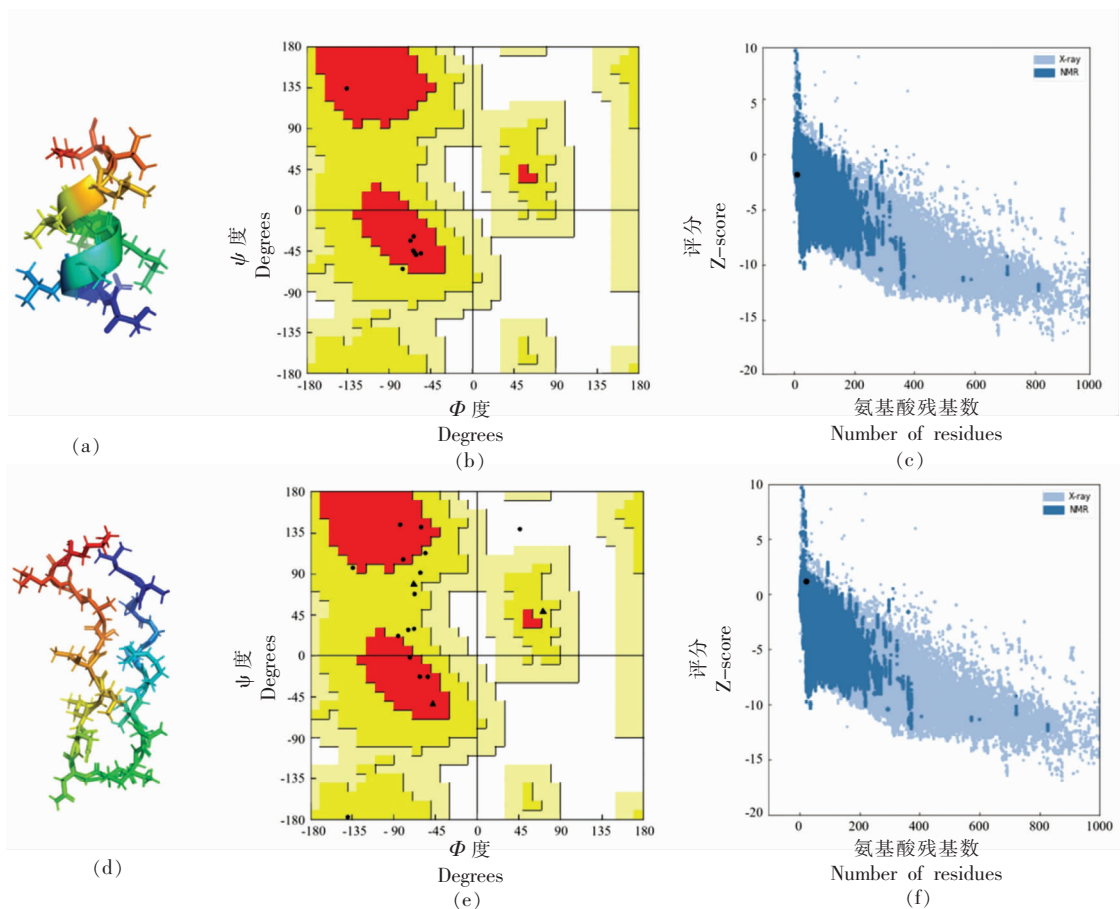
(c)PLN-1 ProSA z-score 评分图



注: PLN-1 肽在最有利的区域具有全部(100%)氨基酸残基, z-Score 评分为-1.56; PLN-2 在理论偏好区具有 80%氨基酸残基, z-Score 评分为 0.03。

图 6 PEP-FOLD 预测 PLN-1 与 PLN-2 的三维结构与分别绘制的 Ramchdran 和 ProSA 验证图

Fig.6 PEP-FOLD predicted 3D structures of PLN-1 and PLN-2 with Ramchdran and ProSA validation plots, respectively



注: PLN-1 在最有利的区域具有全部(87.5%)氨基酸残基, z-Score 评分为-1.61。PLN-2 在最有利的区域具有 40%氨基酸残基, z-Score 评分为 1.72。

图 7 I-TASSER 预测 PLN-1 与 PLN-2 的三维结构与分别绘制的 Ramchdran 和 ProSA 验证图

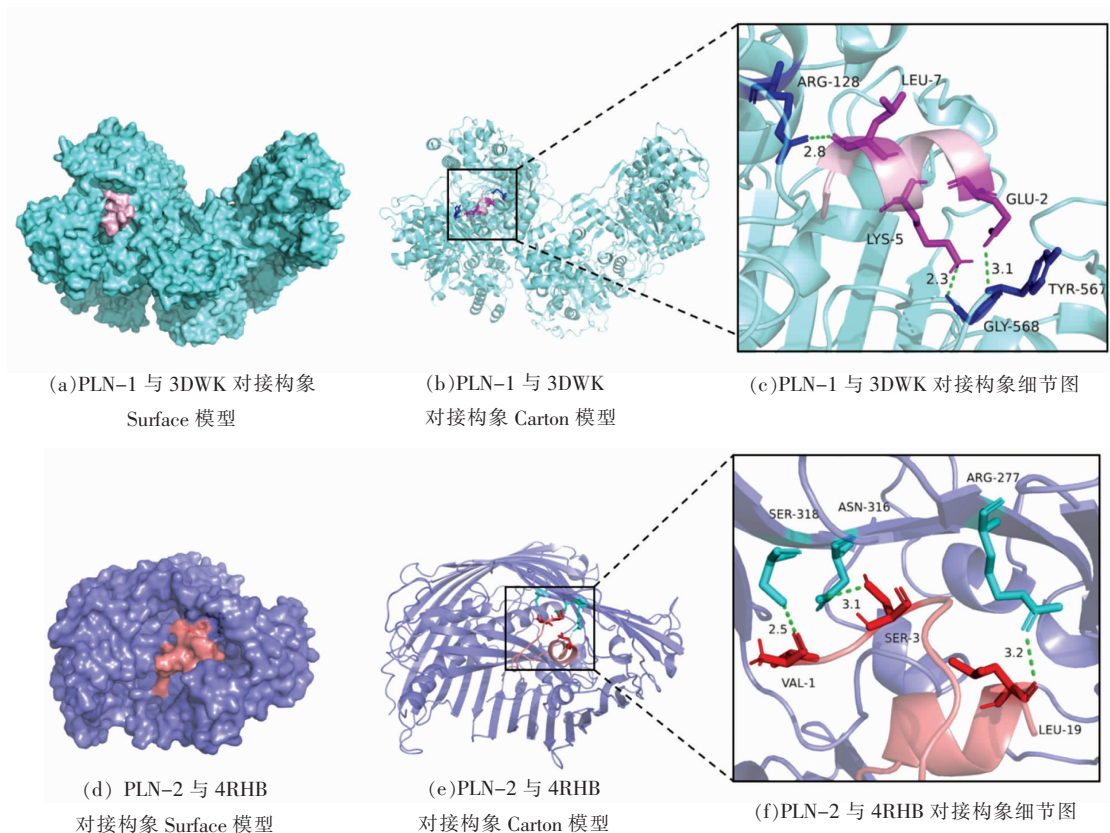
Fig.7 I-TASSER prediction of the 3D structures of PLN-1 and PLN-2 with Ramchdran and ProSA validation maps respectively

PLN-2 在 PEP-FOLD 和 I-TASSER 网站中预测的三维结构有较大差异,结合拉式图和 ProSA 验证,判断 PEP-FOLD 网站预测结果具有更高可信度。因此选择由 PEP-FOLD 网站预测 PLN-1 和 PLN-2 的三维结构模型用于下一步的分子对接。

2.3.2.2 抗菌肽与关键蛋白的分子对接 细菌的细胞壁和细胞膜结构具有提供强度支持、稳定渗透压等作用,是维持细菌正常生长、分裂重要的结构。肽聚糖糖基转移酶/转肽酶(3DWK)直接影响金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖合成,而脂多糖(4RHB)是大肠杆菌细胞膜的重要组成结构,它们的抑制剂被认为是治疗细菌感染的有效候选化合物^[33-34]。通过分子对接进一步探究抗菌肽的作用机制。Autodock Vina 对接结果发现,PLN-1 与 3DWK 结合能为 -48.53 kJ/mol,PLN-2 与 4RHB 结合能为 -60.25 kJ/mol。在分子对接过程中,受体与

配体相互作用的结合能越低,表明这 2 种分子相互作用的亲和力就越大^[35]。因此,与 PLN-1 和 3DWK 的结合相比,PLN-2 与 4RHB 的结合更为紧密。

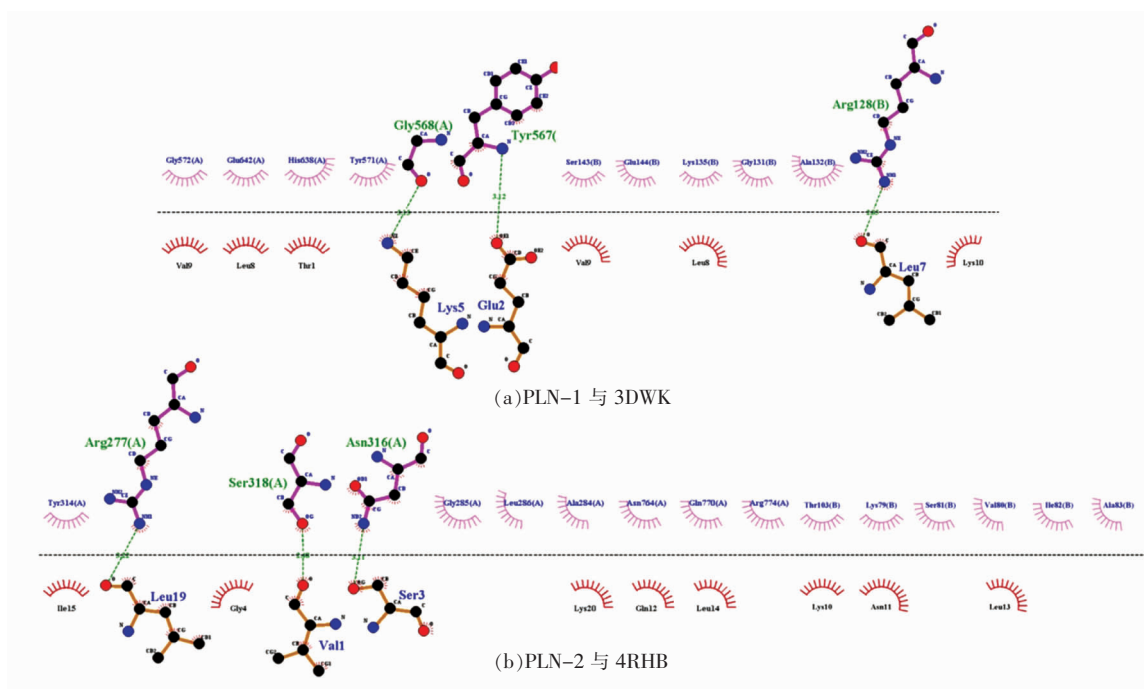
PLN-1 与 3DWK 的最佳对接构象 3D 图如图 8a~8c 所示,PLN-1 可与 3DWK 的 ARG-128、TYR-567、和 GLY-568 残基通过氢键结合。同时在图 9a 的 2D 可视化结果中表现出相同的氢键作用,此外 PLN-1 还与 GLY-52、GLU-642、HIS-638、TYR-571、SER-143、GLU-144、LYS-135、GLY-131、ALA-132 通过疏水相互作用结合。PLN-2 与 4RHB 的最佳对接构象 3D 图如图 8d~8f,PLN-2 与 4RHB 的 SER-318、ASN-316 和 ARG-277 残基通过氢键连接,在图 9b 的 2D 可视化结果同能看到相同的作用。此外 PLN-2 可与 TYR-314、GLY-285、LEU-286、ALA-284、ASN-



注:a 图中浅粉色与浅蓝色分别代表 PLN-1 和 3DWK;c 图中深粉色与深蓝色的 sticks 结构分别为 PLN-1 和 3DWK 产生氢键结合的氨基酸残基;d 图中浅红色与紫色分别代表 PLN-2 和 4RHB;f 图中蓝色与红色的 sticks 结构分别为 PLN-2 与 4RHB 产生氢键结合的氨基酸残基;绿色虚线连接表示氢键。

图 8 分子对接结果的 3D 可视化

Fig.8 3D visualisation of molecular docking results



注:绿色虚线连接表示氢键,放射状圆弧表示涉及疏水相互作用的氨基酸残基。

图9 分子对接结果的2D可视化

Fig.9 2D visualisation of molecular docking results

764、GLN -770、ARG -774、THR -103、LYS -79、SER-81、VAL-80、ILE-82、ALA-83产生疏水相互作用,比 PLN-1 与 3DWK 对接构象具有更强的疏水相互作用。对接结果提示这 2 种抗菌肽分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用,可能是通过抗菌肽与关键蛋白的相互作用介导的。

3 结论

本研究通过生物信息学方法分析植物乳植杆菌 LP315 半纯化上清液来源的肽段,筛选出 PLN-1、PLN-2 两条预测具有抑菌活性,且 ADMET 评估安全可靠的新抗菌肽。通过固相合成方法合成两个肽段,验证 PLN-1 对 G⁺ 的金黄色葡萄球菌具有抑菌活性,PLN-2 对 G⁻ 的大肠杆菌具有抑菌活性,PLN-2 具有更低的 MIC 值和更快速的抑菌作用,并且 2 个肽分别对部分蛋白酶敏感,表明发挥抑菌作用的物质为抗菌肽,且容易被人体分解提高安全性。通过 SEM 和分子对接对其抑菌机制进行探究,推测 2 种肽可能与指示菌的结构关键蛋白发生结合,进而破坏指示菌的细胞壁细胞膜结构,从而产生抑菌作用。这些研究有助于开发新

型食品防腐剂和医药添加剂等产品,进行商业化的应用。

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.
- [2] CROXEN M A, FINLAY B B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(1): 26-38.
- [3] DINGES M M, ORWIN P M, SCHLIEVERT P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(1): 16-34.
- [4] NISA M, DAR R A, FOMDA B A, et al. Combating food spoilage and pathogenic microbes via bacteriocins: A natural and eco-friendly substitute to antibiotics[J]. Food Control, 2023, 149(7): 109710.
- [5] LUEPKE K H, SUDA K J, BOUCHER H, et al. Past, present, and future of antibacterial economics: Increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications[J]. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug

- Therapy, 2017, 37(1): 71–84.
- [6] LIU Y, SAMEEN D E, AHMED S, et al. Antimicrobial peptides and their application in food packaging [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112(6): 471–483.
- [7] LIN S H, CHEN X, CHEN H M, et al. The bio prospecting of microbial-derived antimicrobial peptides for sustainable agriculture [J]. Engineering, 2023, 27(8): 222–233.
- [8] CHERNOV V M, CHERNOVA O A, MOUZYKAN-TOV A A, et al. Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance [J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2019, 14(5): 455–468.
- [9] 翟佳琳. 抑制大肠杆菌植物乳植杆菌的筛选及其抑菌特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- ZHAI J L. Study on screening of *Lactiplantibacillus plantarum* against *Escherichia coli* and its antibacterial properties[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.
- [10] 王铭遥, 郑明静, 任中阳, 等. 凡纳滨对虾抗菌肽的筛选及与 DNA 的结合机制[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 140–151.
- WANG M Y, ZHENG M J, REN Z Y, et al. Screening of antimicrobial peptides from *Penaeus vannamei* to investigate antimicrobial activity and DNA binding mechanism[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 140–151.
- [11] ANGELESCU I R, GROSU-TUDOR S S, COJOC L R, et al. Isolation, characterization, and mode of action of a class III bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(12): 220.
- [12] LIANG Y, YAN J Q, CHEN Z Q, et al. Antibacterial effects of bacteriocin PLNC8 against *Helicobacter pylori* and its potential mechanism of action [J]. Foods, 2022, 11(9): 1235.
- [13] WIEDERSTEIN M, SIPPL M J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(suppl_2): W407–W410.
- [14] SIPPL M J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1993, 17(4): 355–362.
- [15] SHEIK S S, SUNDARARAJAN P, HUSSAIN A S, et al. Ramachandran plot on the web[J]. Bioinformatics, 2002, 18(11): 1548–1549.
- [16] SONG J J, PENG S D, YANG J, et al. Isolation and identification of novel antibacterial peptides produced by *Lactobacillus fermentum* SHY10 in Chinese pickles [J]. Food Chemistry, 2021, 348(1): 129097.
- [17] AN J Y, ZHU W J, LIU Y, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin CAMT2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from marine fish *Epinephelus areolatus* [J]. Food Control, 2015, 51(5): 278–282.
- [18] WAGHU F H, IDICULA-THOMAS S. Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond[J]. Protein Sci, 2020, 29(1): 36–42.
- [19] BOMAN H G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts [J]. Journal of Internal Medicine, 2003, 254(3): 197–215.
- [20] SCOTT M G, HANCOCK R E W. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system[J]. Critical Reviews™ in Immunology, 2000, 20(5): 407–431.
- [21] WIMLEY W C, WHITE S H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces [J]. Nature Structural Biology, 1996, 3(10): 842–848.
- [22] HOQUE RA, YADAV M, YADAVA U, et al. Active site determination of novel plant versatile peroxidase extracted from *Citrus sinensis* and bioconversion of β -naphthol [J]. 3 Biotech, 2023, 13(10): 345.
- [23] BELLAVITA R, BUOMMINO E, CASCIARO B, et al. Synthetic amphipathic β -sheet temporin-derived peptide with dual antibacterial and anti-inflammatory activities [J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11(10): 1285.
- [24] HUYNH E, AKHTAR N, LI J. Efficient production of recombinant protegrin-1 from *Pichia pastoris*, and its antimicrobial and *in vitro* cell migration activity [J]. Front Microbiol, 2018, 9(9): 2300.
- [25] BOMAN H G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts[J]. J Intern Med, 2003, 254(3): 197–215.
- [26] XIONG G L, WU Z X, YI J C, et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and

- comprehensive predictions of ADMET properties [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W5–W14.
- [27] OKELLA H, OKELLO E, MTEWA A G, et al. ADMET profiling and molecular docking of potential antimicrobial peptides previously isolated from African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9(12): 1039286.
- [28] ACHMAD A B, HASNA S M I, GANIS F F, et al. *In Silico* study of chemical compounds in *Plantago major* L. as anti-androgen [J]. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2022, 13(6): 33–45.
- [29] DENISOV I G, MAKRIS T M, SLIGAR S G, et al. Structure and chemistry of cytochrome P450 [J]. *Chem Rev*, 2005, 105(6): 2253–2277.
- [30] YANG H Y, WANG L, YUAN L B, et al. Antimicrobial peptides with rigid linkers against gram-negative bacteria by targeting lipopolysaccharide [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(50): 15903–15916.
- [31] WU D L, DAI M D, SHI Y Q, et al. Purification and characterization of bacteriocin produced by a strain of *Lactocaseibacillus rhamnosus* ZFM216 [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13(11): 1050807.
- [32] QIAO Z, SUN H M, ZHOU Q Q, et al. Characterization and antibacterial action mode of bacteriocin BMP32r and its application as antimicrobial agent for the therapy of multidrug-resistant bacterial infection [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 845–854.
- [33] LOVERING A L, DE CASTRO L, STRYNADKA N C. Identification of dynamic structural motifs involved in peptidoglycan glycosyltransferase [J]. *J Mol Biol*, 2008, 383(1): 167–177.
- [34] QIAO S, LUO Q, ZHAO Y, et al. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane [J]. *Nature*, 2014, 511(7507): 108–111.
- [35] JAHANGIRIAN E, ZARGAN J, RABBANI H, et al. Investigating the inhibitory and penetrating properties of three novel anticancer and antimicrobial scorpion peptides via molecular docking and molecular dynamic simulation [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(24): 1–32.

Screening of Antimicrobial Peptides from *Lactiplantibacillus plantarum* LP315 and Mechanism of Action

WANG Xiao, CHEN Yongfu, ZHA Musu*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract Lactic acid bacteria are an important source of antimicrobial peptides. The aim of this study was to screen antimicrobial peptides with good bacteriostatic activity from peptides derived from the fermentation supernatant of *Lactiplantibacillus plantarum* LP315 and to analyse their bacteriostatic properties and mechanism of action. The specific methods were firstly, virtual screening of antimicrobial peptides using computer prediction tools and databases, and ADMET prediction for evaluating their safety, followed by synthesis of the screened candidate peptides PLN-1 and PLN-2 using solid phase synthesis method. Then the bacteriostatic properties were analysed by MIC, time-kill curve and protease treatment experiments. Finally, the mechanism of action was investigated by scanning electron microscopy (SEM) and molecular docking experiments. PLN-1 (TELAKKLLVK) and PLN-2 (VVSGHRINGKNQLLISAGLK), predicted to have good bacteriostatic activity were screened and evaluated as safe and reliable by ADMET. The peptides were chemically synthesised and examined for their antibacterial properties and were found to be inhibitory against *S. aureus* with a MIC of 5.47 mmol/L for PLN-1 and *Escherichia coli* with a MIC of 2.97 mmol/L for PLN-2. Both of them showed concentration- and time-dependent antibacterial activity. After partial protease treatment, the antibacterial activity of the peptides was lost, indicating that the antibacterial effect was exerted by the antibacterial peptides. The two peptides were observed to damage the cellular structure of *S. aureus* and *E. coli*, respectively, by SEM. Molecular docking verified that the two antimicrobial peptides might bind to the peptidoglycan glycosyltransferase/transpeptidase of *S. aureus* and the lipopolysaccharide structure of *E. coli*, respectively, through hydrogen bond and hydrophobic interactions to exert their antibacterial effects.

Keywords antimicrobial peptide screening; MIC; SEM; molecular docking