

三条新颖短肽筛选及抑菌作用的初报

兰金苹¹, 李莉云^{1*}, 汪洋¹, 王宪云¹, 刘丽娟¹, 刘国振¹, 成雄鹰²

¹ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001

² Vitigen Limited Liability Company, Cary, NC27518, USA

摘要: 【目的】为了发现新的农作物病原菌抗菌肽, 人工设计并构建了大容量短肽文库, 从中筛选并合成 96 条短肽用于鉴定其对农作物病原菌的抑菌活性。【方法】采用琼脂扩散法, 对靶标菌—棉花枯萎病菌 (*Fusarium f. sp. vasinfecum*)、棉花红腐病菌 (*Fusarium moniliforme*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*) 和马铃薯早疫病菌 (*Alternaria solani*) 进行抑菌初筛, 并测定了有抗菌作用短肽的最小抑菌浓度和抑菌持久性。【结果】得到了 A6、D4 和 F10 对上述四种病原真菌抑菌效果较强, 抑菌时间较长的抗菌肽, 通过与抗菌肽数据库氨基酸序列对比, 未见这 3 条抗菌肽的同源序列。【结论】研制的 3 条短肽属于新颖抗菌肽, 为防治农作物真菌病害提供了新的基因资源。

关键词: 新颖抗菌肽, 筛选, 病原真菌, 抑菌作用

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)12-1675-06

植物病原菌的多样性和变异性给植物病害的防治带来很大困难, 尤其是农作物病原菌的危害给作物产量带来了巨大损失。植物病原菌防治的传统方法是化学防治, 此方法虽然收效快但污染环境, 影响人、畜健康, 并引起抗药性使病虫害更加猖獗; 抗病育种改良作物抗病性是病害防治的另一重要途径, 但它是根据分离群体的表型进行选择, 经常受到环境条件、显隐性关系和抗病遗传规律不明确等因素的影响, 并且面临着致病菌适应性的挑战^[1], 因此严重制约了传统育种方法的应用和成效。随着基因工程技术的迅猛发展, 利用转基因的方法创造并选育出抗病性良好且遗传稳定的转基因植株, 为植物抗病育种提供了新的途径。例如, 将 *RC7* 基因和 *Xa21* 基因转入水稻品系后, 转基因植株显著提高了对纹枯病菌和白叶枯病的抗性^[2-3]; 将家蚕的抗菌

肽基因 *cecropin A*、*cecropin B* 转入水稻中, 均表现病斑减少, 抗病能力增强^[4-5]。目前, 转 *Cecropin B* 和 *Shiva A* 基因樱桃已由农业部批准进入田间实验^[6]。

提高作物抗病性是农作物增产稳产的关键, 其有效途径之一是向作物导入各种抗病基因, 其中包括编码抗菌肽的基因。抗菌肽是由多种生物细胞特定基因编码经外界条件诱导产生的一类具有广谱抗菌、真菌、病毒、原虫、抑杀肿瘤细胞等活性作用的多肽。研究表明, 以 *Cecropin B* 基因序列为蓝本设计并合成新的抗菌肽基因转入到作物中, 提高了作物对枯萎病、青枯病等病害的抗性^[7-8]。

枯萎病是棉花的主要病害, 红腐病也严重影响我国棉花的产量, 目前已发现一些抗菌基因, 例如天麻抗菌蛋白能够提高棉花对枯萎病菌的抗病性^[9]; 小麦根腐病是多种病原菌复合侵染导致的病, 研究

基金项目: 国家自然科学基金 (30670175, 30730007); 国家“973 项目” (2007CB109201, 2006CB101705)

* 通信作者。Tel: +86-0312-7528787; E-mail: liliyun@hebau.edu.cn

作者简介: 兰金苹 (1982-), 女, 河北唐山人, 博士研究生, 主要从事植物分子生物学方面研究。E-mail: lanjinping_mbb@126.com

收稿日期: 2011-07-06; 修回日期: 2011-10-18

显示几丁质酶等可改良小麦对根腐病菌的抗性^[10-11];而对棉花红腐病菌和马铃薯早疫病菌的抗菌基因研究不多,只有报道一些植物提取物或木霉菌对其有拮抗作用^[12]。但还未见有关抗菌肽对这些病原菌抑菌作用的报道。

本研究旨在筛选出针对这四种农作物病原菌的新型抗菌肽,分析这些抗菌肽抑菌作用的浓度依赖性和时效性,以使用基因工程方法提高作物对这四种农作物病原菌的抗性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 靶标菌株:检测合成短肽抑菌活性所用的病原菌由河北农业大学植物病理实验室提供,分别为:棉花枯萎病菌(*Fusarium f. sp. vasinfecum*)、棉花红腐病菌(*Fusarium moniliforme*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)和马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)。

1.1.2 真菌培养基:改良1/2 PDA 固体培养基,即为PDA培养基所用试剂的一半。

1.1.3 主要试剂和仪器:农药:50%多菌灵,绿亨6号,苯醚甲环唑和马铃薯均购自河北保定农资市场;乙酸,碳酸氢铵购自天津市天大化工实验厂;DMSO和琼脂糖购自Sigma公司;硫酸卡那霉素、葡萄糖和三氟乙酸购自上海索莱宝生物科技有限公司;IPTG和台盼蓝染料购自Fermentas UAB公司;超声破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司;微型离心机购自德国威尔斯公司;蛋白质电泳系统购自美国伯乐(Bio-Rad)公司;电热恒温培养箱购自天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 菌种活化及菌悬液制备

接真菌菌饼接种到PDA固体培养基,28℃培养至菌丝长满。加入少量无菌水将菌丝刮下、研碎,收集悬液。用血球计数板计数调整至孢子浓度为 1×10^6 个/mL,4℃保存菌液。

1.3 短肽文库的筛选

利用本实验室构建的寡核苷酸表达文库^[13-14],诱导基因表达后,通过台盼蓝染色方法筛选抑菌克隆。提取阳性克隆质粒DNA,经测序得到编码抗菌肽的DNA序列,推导出相应的多肽序列,用于多肽合成。

1.4 短肽的合成与溶解

短肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成,初筛用短肽未做纯化,后续试验使用的短肽经过脱盐纯化,纯度大于90%。合成的短肽根据其酸碱性分别用1%碳酸氢铵或用0.1%乙酸溶解,配制成浓度为10 mmol/L的短肽母液。抑菌筛选前,取1 μL短肽母液经15% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色检测合成结果。

1.5 抑菌试验

采用琼脂扩散法^[15]进行体外抑菌实验,取5 μL浓度为1 mmol/L短肽试样点到直径为7 mm的滤纸片上。正对照使用农药,50%多菌灵(粉末)、50%绿亨6号(液体)和50%苯醚甲环唑(液体),同时加0.1%乙酸,1%碳酸氢铵,0.1%三氟乙酸和1%二甲基亚砷作为溶剂对照,水为负对照。加短肽后,静置10 min,28℃培养,共培养30 d,每隔24 h左右观察测量一次并拍照。

1.6 抑菌作用持久性的测定

纯化的短肽稀释5个浓度,分别是0 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L和4 mmol/L进行抑菌试验,培养2 d、3 d、7 d、30 d时,观察每个浓度抑菌圈的变化。

1.7 最小抑制浓度的测定

利用Hughes等人的培养基稀释法^[16]在96孔板中加入不同浓度的短肽试样,然后加入 10^5 CFU/mL的指示菌,使含短肽试样与供试菌的培养基总体积为200 μL,28℃恒温振荡2 d后观察各浓度孔中的混浊度,以肉眼不可见菌丝生长的最低短肽浓度为最小抑制浓度(MIC)。

1.8 短肽新颖性和结构分析

短肽的氨基酸序列在抗菌肽数据库^[17]中进行序列同源性对比,以便确定其新颖性;利用肽结构预测软件(PEP-FOLD)进行短肽二级结构预测^[18];采用“DAS”方法对短肽进行跨膜结构的预测^[19]。

2 结果和讨论

2.1 短肽文库中筛选短肽

用台盼蓝染色方法筛选了 1×10^7 个表达随机寡核苷酸的大肠杆菌菌落,其中约有1000个鉴定为阳性克隆,占筛选菌落的0.01%。研究表明,具有抗菌活性的多肽也可能有抗真菌的活性^[20]。因

此,本研究用这些对大肠杆菌有抑菌活性的短肽来筛选抗真菌的短肽。

2.2 抗真菌短肽的筛选

从上面实验中选取 96 个阳性克隆,根据核苷酸序列所对应的序列用来合成相应的短肽,并测定其抑菌活性。短肽粉末溶解后经 15% 的 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色检测表明短肽比较纯,且大小与理论值相符。

本研究首先以琼脂扩散法初选对农作物病原真菌有抑菌活性短肽。靶标菌为小麦根腐病菌、马铃薯早疫病菌和棉花枯萎病菌等。试验时,取 5 μL 浓度为 1 mmol/L 的短肽试样点到置于涂布有真菌菌丝培养基表面的滤纸片上。经 24 - 48 h 培养后,观察各试样的抑菌活性。虽然大多数供试短肽样品没有产生明显的抑菌圈,但有些短肽会在培养基表面真菌菌苔上产生不同大小的抑菌圈。本研究共测试了 96 条短肽对小麦根腐病菌、马铃薯早疫病菌和棉花枯萎病菌等的体外抑菌活性,共发现 10 条有显著抗菌活性的短肽(表 1)。这些短肽至少对一种病原菌有抑菌活性。有些能抑制所有供试靶标菌生长,如 A6、D4 和 F10。而其它多对 1 - 2 种靶标菌有活性(表 1)。如 F3 对棉花枯萎病菌有抑制作用,H8 只对小麦根腐病菌有抑菌活性。短肽对真菌的抑菌机制可能与细菌不同,因为真菌细胞壁含有由葡聚糖和几丁质,抗菌肽可通过抑制其组分的合成而达到杀菌作用,或是与真菌内细胞器作用来抑制^[21]。本研究的结果显示,通过细菌活性筛选得到的抗菌肽有 10% 以上有抗真菌活性,这为发现新的抗真菌肽开辟了新的途径。

表 1 短肽对不同病原真菌的抑菌效果(抑菌圈宽度)

Table 1 Inhibition of peptides on growth of fungal pathogens (Width of inhibition zone/mm)

Peptide	<i>F. vasinfecum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>A. Solani</i>
A6	1	1.5	1.5	0.5
C1	1	1		
D2			1	2
D4	1	1	2	1
E2	1			
F3	1.5			
F8	1.5			
F10	1.5	1	1	2
H2	1			
H8			1	

2.3 抗真菌短肽对病原菌抑制的浓度依赖性

根据以上结果,我们对 3 条广谱抗菌肽 A6、D4 与 F10 作了进一步研究,试验了不同浓度(0、0.5、1、2、4 mmol/L)下短肽对 4 种靶标菌的抑菌作用,观察浓度与抑菌圈的大小关系,结果见图 1。结果表明,一般来说随着短肽浓度的增加,短肽产生的抑菌圈的大小也随之增大。短肽 A6 和 F10 对棉花红腐病菌的活性显著高于 D4 短肽,这一点在高浓度(3 - 4 mmol/L)下尤其显著(图 1)。经检测,F10 短肽对棉花红腐病菌的最小抑菌浓度为 300 μg/mL - 400 μg/mL。另外,短肽 F10 在浓度 2 mmol/L 以下对马铃薯早疫病菌的活性显著高于短肽 A6 与 D4。对棉花枯萎病菌与小麦根腐病菌,这 3 条广谱抗菌肽显示类似的活性抑菌趋势(图 1)。

2.4 短肽对病原菌抑菌作用的持久性

与大多数化学农药相比,肽类化合物通常不太稳定,容易被肽酶和蛋白酶降解,因而影响其抑菌功效。对此,我们观察了这些短肽对棉花红腐病菌、棉花枯萎病菌和马铃薯早疫病菌的抑菌作用的持久性。在开始培养的 24 h 内菌丝生长缓慢,抑菌圈不易看清,但随着培养时间的延长至 2 d,可见明显的抑菌圈,如图 4 中多肽 F10 在 1 mmol/L 浓度下抑菌圈在以后的 30 d 内基本保持不变(代表图如图 2)。这些结果说明,这些短肽具有较强的化学稳定性,因此抑菌作用时间较长,显然这一性质在实用中非常重要。

2.5 短肽序列新颖性和二级结构的预测

基于以上试验,筛选到了 3 条对真菌有较强抑菌活性的短肽 A6、D4 和 F10(表 2)。为确定其序列的新颖性,在抗菌肽数据库^[17]中进行序列同源性对比。结果表明,这些短肽与已知的抗菌肽氨基酸序列的同源性低于 40%,而且这些短肽均为阳离子型,所带净电荷分别为 6、5 和 9(表 2)。研究表明,许多抗菌肽为阳离子型多肽,所带正电荷与细菌细胞膜上的负电荷相互作用,从而导致细菌细胞膜结构的紊乱^[22]。利用“DAS”方法,预测 A6 和 F10 短肽具有跨膜结构,这种结构可能插入真菌的细胞膜中。通过 PEP-FOLD 进行二级结构的预测,结果显示这 3 条短肽的二级结构中所占 α-螺旋,β-折叠,无规则卷曲和转角区域的比例各不同(表 2,图 3)。然而,有关这些肽的结构与功能关系,将需要进一步研究来分析。

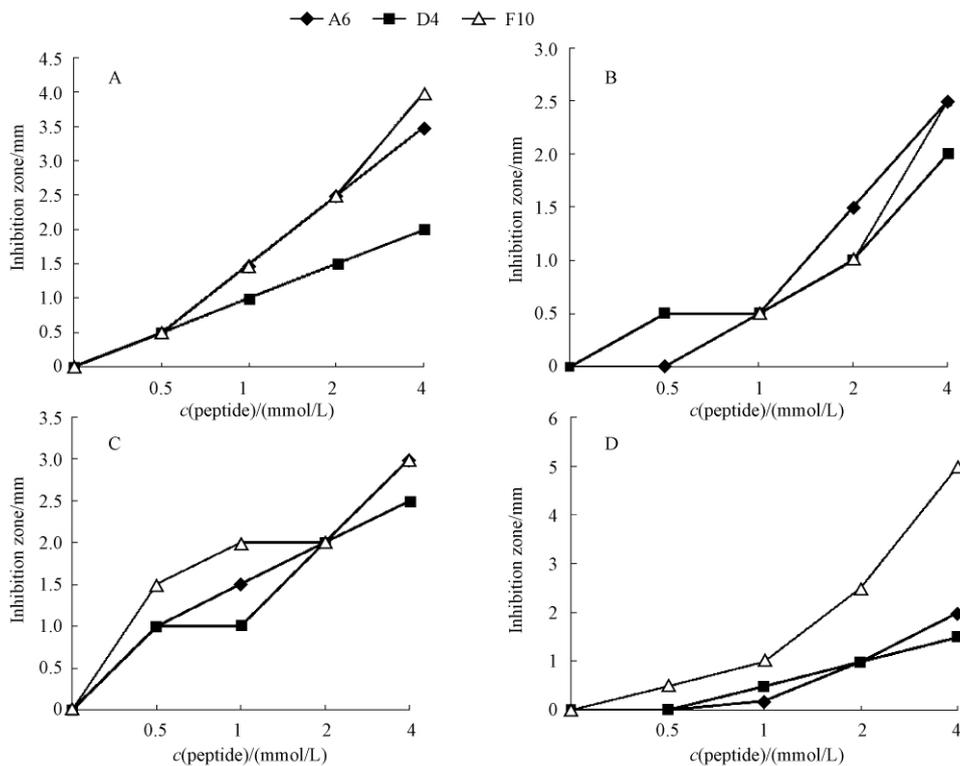


图 1 不同浓度抗菌肽的浓度抑菌活性曲线

Fig. 1 Effect of peptide concentrations on their antimicrobial activity against fungal pathogens. A: *F. moniliforme*; B: *F. vasinfecum*; C: *B. sorokiniana*; D: *A. Solani*.

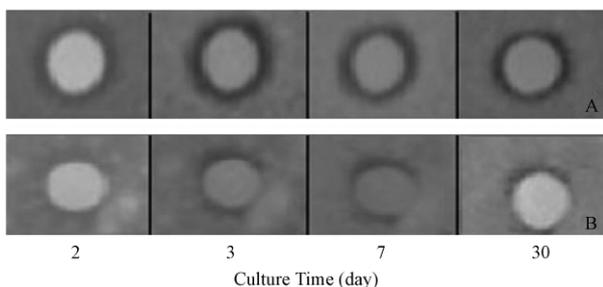


图 2 抗菌肽 F10 对病原真菌抑制作用的持续性测定

Fig. 2 Inhibition durability of peptide F10 against fungal pathogens. A: *F. vasinfecum*; B: *A. Solani*.



图 3 抗菌肽二级结构预测

Fig. 3 Prediction of secondary structure of antimicrobial peptides.

表 2 抗菌肽的性质及结构分析

Table 2 Property and structural analysis of antimicrobial peptides

Peptide	Amino acid sequence	Net charge	Transmembrane segment	Hydrophobic Amino acid/%	α -helix %	β -sheet %	Coil %	T %
A6	FCKRSPLLRTCYRIKLSRPY	6	1	35	35	0	45	20
D4	HPGFRLRRCLRS	5	0	25	55	10	25	10
F10	RMTHKSNRRPLKHIVHK	9	1	26	31	25	28	16

到目前为止,已有数百条抗菌肽从各种生物有机体中分离出来。然而,从生物有机体中分离和鉴

定抗菌肽是一项复杂的过程,因此本研究中,我们通过寡核苷酸序列的表达而获得多肽文库,从中筛选

并鉴定出新的抗菌肽。这种方法不同于传统的抗菌肽筛选方法:首先,与天然抗菌肽相比这种方法会产生更多的多肽序列;其次,可以通过体内表达来鉴定抗菌肽,并且其编码的序列通过载体 DNA 测序便可得到。这些抗菌肽最初是通过大肠杆菌的抑制活性而初步鉴定的,本研究显示它们也具有抑制真菌的活性。农作物病害大部分是由真菌感染引起的,因而抗真菌剂能抑制病害的发生。然而,一些短肽的抗菌活性还不够理想,这就需要根据抗菌肽自身特征进行有目的地改造和设计。为了更好地利用和改造抗菌肽,还需要对抗菌肽的作用机制进行进一步研究与探索。

本研究中合成的新颖抗菌肽,其编码的 DNA 序列可以通过转基因方法使植物产生抗病性,因此,这些新颖抗真菌肽,将对农作物病原菌的防治提供新的基因资源。化学农药和各种抗生素的滥用、耐药性、残留等问题已经成是世界性的重大难题,随着抗菌肽应用领域的不断拓展及其作用机理研究的不断深入发展,抗菌肽以其独特的性质和抗菌机理必将在农业、医药业、食品工业等领域充分发挥其优势,为人类的生产生活提供巨大帮助。

参考文献

- [1] Vilcinskas A, Gross J. Drugs from bugs: the use of insects as a valuable source of transgenes with potential in modern plant protection strategies. *Journal of Pest Science*, 2005, 78(4): 187 - 191.
- [2] Datta K, Tu J, Oliva N, Ona H, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S, Datta SK. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science*, 2001, 160(3): 405 - 414.
- [3] Zhai W, Li X, Tian W, Zhou Y, Pan X, Cao S, Zhao X, Zhao B, Zhang Q, Zhu L. Introduction of a rice blight resistance gene, Xa21, into five Chinese rice varieties through an Agrobacterium-mediated system. *Science China Life Sciences*, 2000, 43(4): 361 - 368.
- [4] Sharma A, Sharma R, Imamura M, Yammakawa M, Machii H. Transgenic Expression of Cecropin B. An antibacterial peptide from bombyx mori. confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Letters*, 2000, 484(1): 7 - 11.
- [5] Campo S, Manrique S, Garcia-Martinez J, San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6: 1 - 24.
- [6] 方宏筠,王关林,王火旭,贾士荣,董云洲,唐益雄. 菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株. *植物学报 (Chinese Bulletin of Botany)*, 1999, 41(11): 1192 - 1198.
- [7] 贾士荣,屈贤铭,冯兰香,唐惕,唐益雄,刘坤,赵艳丽,白永延,蔡敏莺. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 1998, 31(3): 5 - 12.
- [8] Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(416): 1685 - 1695.
- [9] 危晓薇,师维军,葛峰,徐利民,王义琴. 新疆陆地棉转基因抗病品系材料的获得. *新疆农业科学 (Xinjiang Agricultural Sciences)*, 2007, 4: 402 - 407.
- [10] 邢全华,王广金,石金锋,王岳光,李忠杰,梁凤山,金德敏,王斌. β -1,3-葡聚糖酶基因高效表达载体的构建及对小麦的转化. *遗传学报 (Journal of Genetics and Genomics)*, 2003, 8: 717 - 722.
- [11] 郭玉莲,魏相峰,赵伯福,郑铁军,李宝英. 几丁质酶产生菌的筛选及其对小麦根腐病菌的抑制作用. *东北农业大学学报 (Journal of Northeast Agricultural University)*, 2006, 4: 437 - 440.
- [12] 高丽辉,左豫虎,台莲梅,刘淑霞. 木霉菌 T-115D 对马铃薯早疫病病菌的拮抗作用. *农业科技通讯 (Bulletin of Agricultural Science and Technology)*, 2010, 8: 45 - 50.
- [13] Loit E, Wu K, Cheng X, Hincke MT, Altosaar I. Functional whole-colony screening method to identify antimicrobial peptides. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(3): 425 - 431.
- [14] Cheng X, Liu G, Ye G, Wang H, Shen X, Wu K, Xie J, Altosaar I. Screening and cloning of antimicrobial DNA sequences using a vital staining method. *Gene*, 2009, 430: 132 - 139.
- [15] Kato Y. Humoral defense of the nematode *Ascaris suum*: antibacterial, bacteriolytic and agglutinating activities in the body fluid. *Zoological Science*, 1995, 12(2): 225 - 230.
- [16] Hughes CE, Bennett RL, Beggs WH. Broth dilution testing of *Candida albicans* susceptibility to ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31(4): 643 - 646.

- [17] Wang Z , Wang GS. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* , 2004 , 32 (Database issue) : D590 – 592.
- [18] Maupetit J , Derreumaux P , Tuffery P. PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Research* , 2009 , 37 (Web Server issue) : W498 – 503.
- [19] Cserzo M , Wallin E , Simon I , Elofsson A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering* , 1997 , 10 (6) : 673 – 676.
- [20] Rajasekaran K , Stromberg KD , Cary JW , Cleveland TE. Broad-spectrum antimicrobial activity in vitro of the synthetic peptide D4E1. *Journal of agricultural and food chemistry* , 2001 49 (6) : 2799 – 2803.
- [21] 张杰 , 张双全. 抗真菌肽对真菌作用机制研究进展. *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)* , 2005 , 1 : 13 – 17.
- [22] Powers JP , Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* , 2003 , 24 (11) : 1681 – 1691.

Screening of three novel antimicrobial peptides with anti-fungal pathogens

Jinping Lan¹ , Liyun Li^{1*} , Yang Wang¹ , Xianyun Wang¹ , Lijuan Liu¹ , Gouzhen Liu¹ , Xiongying Cheng²

¹ College of Life Sciences , Agricultural University of Hebei , Baoding 071001 , China

² Vitegen Limited Liability Company , Cary , NC27518 , USA

Abstract: [Objective] In order to discover novel antimicrobial peptides against important crop pathogens , we designed and screened a high capacity random peptide library and isolated a number of clones expressing peptides with antifungal activity. We selected 96 peptides from the library and synthesized their sequence , which were used to assay their activity against crop fungal pathogens. [Methods] Using agar diffusion assay , these peptides were assayed for their activity against pathogens that cause cotton Fusarium wilt (*Fusarium f. sp. vasinfecum*) , cotton red rot (*Fusarium moniliforme*) , wheat spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) and potato early blight (*Alternaria solani*). [Results] The three random peptides , A6 , D4 and F10 , showed the strongest activity against the above four crop fungal pathogens. Through Blastp analysis , we did not find they have homologous sequences with known antimicrobial peptides. [Conclusion] The novel antimicrobial peptides will provide gene resources for preventing important crop pathogens.

Keywords: novel antimicrobial peptides , screening , fungal pathogens , anti-fungal activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670175 , 30730007) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB109201 , 2006CB101705)

* Corresponding author: Tel: +86-0312-7528787; E-mail: liliyun@hebau.edu.cn

Received: 6 July 2011 / Revised: 18 October 2011