

## 抗菌肽 Buforin II 衍生物与大肠杆菌基因组 DNA 的作用机制

郝刚, 施用晖, 唐亚丽, 乐国伟\*

(江南大学食品学院, 食品营养与功能因子研究中心, 无锡 214122)

**摘要:**【目的】研究抗菌肽 Buforin II 的衍生物 BF2-A/B 与大肠杆菌基因组 DNA 的作用机制。【方法】琼脂糖电泳检测肽对 DNA 的断裂作用, 凝胶阻滞实验研究肽与 DNA 的结合作用, 圆二色谱考察结合肽后 DNA 结构的变化, 荧光光谱分析肽与溴化乙锭竞争性嵌入 DNA 以及磷酸根对肽与 DNA 相互作用的影响。【结果】BF2-A/B 不断裂基因组 DNA 而是结合 DNA, 使 DNA 双螺旋结构变得松散, 削弱碱基对间的堆积作用, 并取代 EB, 使 EB-DNA 复合体系荧光减弱。而  $\text{PO}_4^{3-}$  的加入减弱了肽对 DNA-EB 荧光的淬灭作用。【结论】衍生肽与 DNA 的结合方式是先靠静电引力吸附到 DNA 磷酸基团上, 随即插入双螺旋沟槽, 嵌入碱基对间。BF2-B 有更多的正电荷, 更强的插入沟槽和嵌入碱基对的能力, 使得其结合 DNA 的能力比 BF2-A 强。

**关键词:** 抗菌肽; Buforin II; 大肠杆菌; 基因组 DNA; 作用机制

**中图分类号:** Q936    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0328-06

自 21 世纪 70 年代瑞典科学家 Boman 等<sup>[1]</sup>在天蚕血淋巴中首次发现抗菌肽后, 人们相继在两栖动物、昆虫、鱼类、哺乳动物等<sup>[2-3]</sup>各种生物中发现了大量的抗菌肽。抗菌肽一直是生命科学研究的热点之一, 特别是在目前抗生素的耐药性日益严峻的情况下, 抗菌肽的应用价值倍受重视。抗菌肽种类繁多, 不同抗菌肽抑菌的作用机制不同, 尚没有一个涵盖所有抗菌肽作用机理的理论。由于天然抗菌肽大多以细胞膜为主要作用靶点, 因此各国学者研究抑菌机理主要集中在膜作用机制上<sup>[4-5]</sup>。近年来, 随着对抗菌肽作用机理的深入研究, 人们发现有些抗菌肽并不破坏膜结构, 而是直接穿过胞膜, 作用于胞内靶点达到抑菌目的<sup>[6]</sup>。这种独特的抑菌机制使得它的抗菌活性不受细胞膜成分的影响, 无论对  $G^+$ 、 $G^-$  菌还是真菌都有较强的抑菌活性, 抗菌谱较广, 不易产生耐药性。目前研究者已经找到了多种胞内作用的靶分子, 如核酸、蛋白和信号转导通路等<sup>[7]</sup>, 这些肽通过影响基因的复制、表达或调控, 抑

制呼吸作用, 摧毁细胞骨架, 抑制和影响胞内的信号传导及其网络调控, 改变细胞的生化代谢来杀伤微生物。

抗菌肽 Buforin II 是韩国学者 Park 等<sup>[8]</sup>从亚洲蟾蜍的胃组织中分离纯化的有 21 个残基的抗菌肽。Buforin II 抗菌活性很强, 抗菌谱广, 它不破坏细胞膜, 而是通过高效的穿膜后进入胞质强烈结合 DNA 来抑制微生物生长<sup>[9]</sup>。Park 等人在研究 Buforin II 的构效关系时, 在其 N-端截去了 4 个冗余残基后产生了一个衍生肽, 它的抑菌活性比 Buforin II 还要强<sup>[10]</sup>。在本实验室的前期研究中, 我们将此衍生肽命名为 BF2-A (RAGLQFPVGRVHRLLRK), 并在其结构特征基础上, 设计并化学合成了一个新的衍生肽, 命名为 BF2-B (RAGLQFPLGRLLRLLRLLR)。我们研究了这两个衍生肽对细菌细胞膜的作用机制, 发现它们都能穿透细胞膜而不破裂细胞<sup>[11]</sup>。本文以大肠杆菌为对象, 研究 BF2-A/B 作用细菌后对基因组 DNA 的影响, 通过凝胶阻滞实验、圆二色谱以

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30871805); 高校学科创新引智计划 (“111”计划, B07029)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85917789; E-mail: lgw@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 郝刚 (1978 -), 男, 重庆人, 博士研究生, 主要从事食品营养与功能因子方面的研究。E-mail: indianahg@hotmail.com

**收稿日期:** 2009-09-15; **修回日期:** 2009-11-01

及 EB 竞争性结合实验研究肽与 DNA 的作用方式。

## 1 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 衍生肽 BF2-A/B:** 目的肽由上海波泰生物科技有限公司采用固相化学合成法合成, 纯度  $\geq 95\%$ 。

**1.1.2 大肠杆菌基因组 DNA:** 采用 CTAB 法<sup>[12]</sup> 提取, 测 DNA 溶液  $OD_{260}/OD_{280} = 1.96$ , 纯度符合实验要求。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 溴化乙锭(EB)及琼脂糖购自 Amersco 公司。MOS 450 圆二色谱仪, 法国 Biologic 公司。650-60 荧光分光光度计, 日本日立公司。

### 1.2 抗菌肽对大肠杆菌的抗菌活性检测

按最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 测定法检测 BF2-A/B 对大肠杆菌的抗菌活性。将培养至对数生长期的待测菌液加入 96 孔细胞培养板, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 再向各孔中加入 50  $\mu\text{L}$  经倍比稀释的抗菌肽 BF2-A/B, 使各孔中抗菌肽浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别为 0.5、1、2、4、8、16。阴性对照为加入无菌水, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 6 h, 酶标仪在  $\lambda = 630 \text{ nm}$  检测 OD 值。与初始值相比, OD 值未有显著变化的最小浓度定义为抗菌肽对该菌的最低抑菌浓度。

### 1.3 抗菌肽作用细菌后对基因组 DNA 的影响

将培养至对数生长期的大肠杆菌收集离心, 用 LB 培养基稀释成  $1 \times 10^8 \text{ CFU}/\text{mL}$ , 分别加入抗菌肽 BF2-A/B, 使其终浓度为 MIC, 37 $^{\circ}\text{C}$  作用不同时间后离心收集。用 CTAB 法提取基因组 DNA, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。

### 1.4 DNA-肽结合凝胶阻滞实验

DNA 结合缓冲液<sup>[13]</sup> 溶解抗菌肽 BF2-A/B, 并作梯度稀释。在离心管中加入 5  $\mu\text{L}$  0.5 mg/mL 的 DNA 溶液, 再分别加入 5  $\mu\text{L}$  经梯度稀释的抗菌肽溶液, 阴性对照为 PBS 缓冲液。室温下孵育 10 min 后, 加入上样缓冲液, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。

### 1.5 圆二色谱检测结合肽后 DNA 的结构

圆二色谱仪于室温下测量基因组 DNA 及加入抗菌肽后的二级结构。在 1 mm 径长的石英皿中加入 100  $\mu\text{L}$  0.5 mg/mL 的 DNA 溶液, 再加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的衍生肽 BF2-A/B, 混匀。阴性对照为加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液。扫描范围为 220-320 nm, 狭缝 2 nm, 扫描速度为 10 nm/min, 每个样品连续扫描 4 次, 取平均值。

## 1.6 抗菌肽与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱分析

在 5 mL 离心管中分别加入 1 mL 0.5 mg/mL 的 DNA 溶液, 15  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB 溶液, 以及 1 mL 不同浓度的抗菌肽溶液, 阴性对照为加入 PBS 缓冲液。在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴箱中避光放置 10 min, 用荧光分光光度计在 550-750 nm 范围内进行扫描, 狭缝设置为  $E_x = E_m = 5 \text{ nm}$ , 激发波长  $\lambda = 535 \text{ nm}$ , 样品池为 1 cm 石英池。

## 1.7 磷酸根离子 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 对抗菌肽与 DNA 相互作用的影响

在 EB (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )-DNA (0.5 mg/mL) 体系中加入 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗菌肽, 形成 EB-DNA-肽的复合体系, 然后滴加不同浓度的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液, 用荧光分光光度计检测其荧光强度 Ft。未加抗菌肽的 EB-DNA 复合体系荧光强度  $F_0$ , 计算相对荧光强度 % =  $F_t/F_0 \times 100\%$ 。激发波长  $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ , 发射波长  $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 衍生肽对大肠杆菌的抗菌活性及对基因组 DNA 的影响

我们首先考察了衍生肽对大肠杆菌的抗菌活性, 用最低抑菌浓度 (MIC) 来表示。从表 1 中可知经过重新设计的 BF2-B 对大肠杆菌的抑菌活性要比 BF2-A 强一倍。随后考察了 MIC 的肽作用大肠杆菌不同时间后, 对基因组 DNA 造成的影响, 结果

表 1 抗菌肽 BF2-A/B 对大肠杆菌的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of BF2-A/B for *E. coli*

Microorganism	$c(\text{MIC})/(\mu\text{g}/\text{mL})$	
	BF2-A	BF2-B
<i>Escherichia coli</i>	2	1

Minimal inhibitory concentrations were the average values obtained in triplicates on three independent measurements.

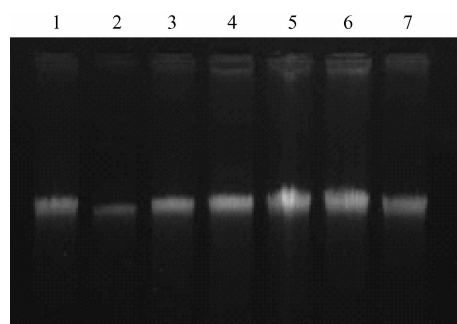


图 1 抗菌肽作用大肠杆菌后基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA from bacterial cells treated by BF2-B (lane 1, lane 3, lane 5) and BF2-A (lane 2, lane 4, lane 6) for 90, 30 and 10 min, respectively. lane 7: negative control.

显示(图1),无论作用多长时间,电泳后的 DNA 并没有呈弥散状,而是保持了完整的条带,这说明抗菌肽在抑菌过程中并没有引起基因组 DNA 的断裂。

## 2.2 DNA-肽结合凝胶阻滞实验

我们接着考察了抗菌肽与 DNA 的相互作用,凝胶阻滞实验发现 BF2-A/B 与基因组 DNA 有很强的结合能力,如图 2 所示。由于 BF2-A/B 与 DNA 强烈的结合,导致复合分子量增大,使得电泳时 DNA 向正极的运动速度减慢,迁移率下降,因此在凝胶中形成长长的拖尾。从图中可以看出,当 BF2-A 为 0.2 mg/mL 时,即开始有阻滞现象,当达到 4.5 mg/mL 时,BF2-A 与 DNA 的强烈结合已经使 DNA 无法跑出点样孔。而当 BF2-B 为 0.1 mg/mL 时,阻滞已经开始,0.4 mg/mL 时,与 BF2-B 的结合使 DNA 一直保留在点样孔里,甚至当大于 0.6 mg/mL 时,BF2-B 与 DNA 强烈结合的程度使 EB 已经无法插入到 DNA 的碱基对中,使得点样孔中的 DNA 没有发出荧光。这暗示我们这两个肽,至少是 BF2-B,在一定的浓度下与 DNA 的作用方式可能包括了与 EB 类似的核酸嵌入作用,在与 DNA 结合时,与 EB 竞争

性的插入到 DNA 碱基对中。实验结果不仅说明了 BF2-A/B 能与 DNA 强烈结合,而且 BF2-B 结合 DNA 的能力比 BF2-A 至少强十倍。而在图 1 中,处理细菌的 BF2-A/B 的浓度分别为 2、1  $\mu\text{g/mL}$  (MIC),显然还不能达到使 DNA 发生阻滞的浓度,因此观察不到 DNA 阻滞现象。

## 2.3 DNA 的圆二色谱图(CD)

我们采用测 DNA 的 CD 谱的方法,研究结合抗菌肽后 DNA 结构的变化,如图 3 所示。在 DNA 的 CD 谱中,270 nm 的正峰是由碱基的堆积作用而产生的,240 nm 的负峰则对应于 DNA 双螺旋结构的 B 型构象;抗菌肽 BF2-A 的加入使 DNA 的负峰和正峰强度都降低,说明 BF2-A 使 DNA 的双螺旋结构变得松散,也削弱了 DNA 碱基对之间的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用。这暗示我们 BF2-A 不仅与 DNA 发生嵌入碱基对之间的作用,而且能发生沟槽相互作用;浓度越高,沟槽相互作用的影响就越明显。BF2-B 也能让 DNA 的螺旋结构变得松散,削弱碱基间的堆积作用,并且让负峰发生红移,说明 DNA 从 B 构型在往 C 构型转变;在高浓度时,已无法检测到 DNA 的负峰,说明 BF2-B 强烈的插入到 DNA 的沟槽中,可能使 DNA 的螺旋构型被破坏,引起了双螺旋解链。比较相同浓度下 BF2-A/B 作用 DNA 的谱图,BF2-B 削弱 DNA 碱基对间堆积力的能力要强于 BF2-A,这说明 BF2-B 嵌入碱基对的能力更强。

## 2.4 抗菌肽与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱分析

EB 是一种高度灵敏的荧光染色剂,能通过嵌入的方式插入双链 DNA 碱基对间,在紫外光照射下呈现荧光。溴化乙锭-DNA 复合物的荧光产率比没有结合 DNA 的染料高出 20-30 倍。当它能与 DNA 发生类似嵌入作用的分子共存时,便相互竞争与 DNA 的结合,使荧光强度减弱。因此可以通过测定 DNA-EB 体系的荧光光谱的变化来研究抗菌肽与 DNA 的结合方式等。由图 4 可以看出:EB 染料的荧光特征峰在 590 nm 处,随着加入的抗菌肽 BF2-A/B 浓度不断增大,荧光强度明显降低,这表明抗菌肽 BF2-A/B 能与 EB 竞争性的插入到 DNA 的碱基对中,使 EB-DNA 复合体系荧光减弱。其中还能在 BF2-B 的图中看到其最大发射波长发生紫移,由 590 nm 移向 580 nm 附近,发生紫移是由于 EB 从 DNA 内部疏水环境进入到水溶液中,即抗菌肽取代了 EB,这些都充分说明抗菌肽与 DNA 发生嵌入式结合。并且相同浓度下,BF2-B 中 EB-DNA 复合体

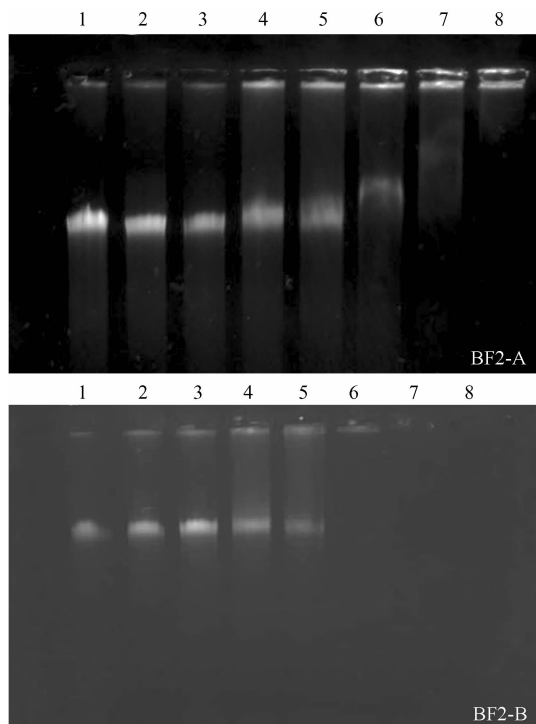


图 2 DNA-抗菌肽结合凝胶阻滞电泳图

Fig. 2 Gel retardation assay of DNA-peptides binding. The samples contained the following concentration of BF2-A of lane 1-8: 0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 1.1 mg/mL, 2.2 mg/mL, 4.5 mg/mL, and BF2-B of lane 1-8: 0 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 1.1 mg/mL.

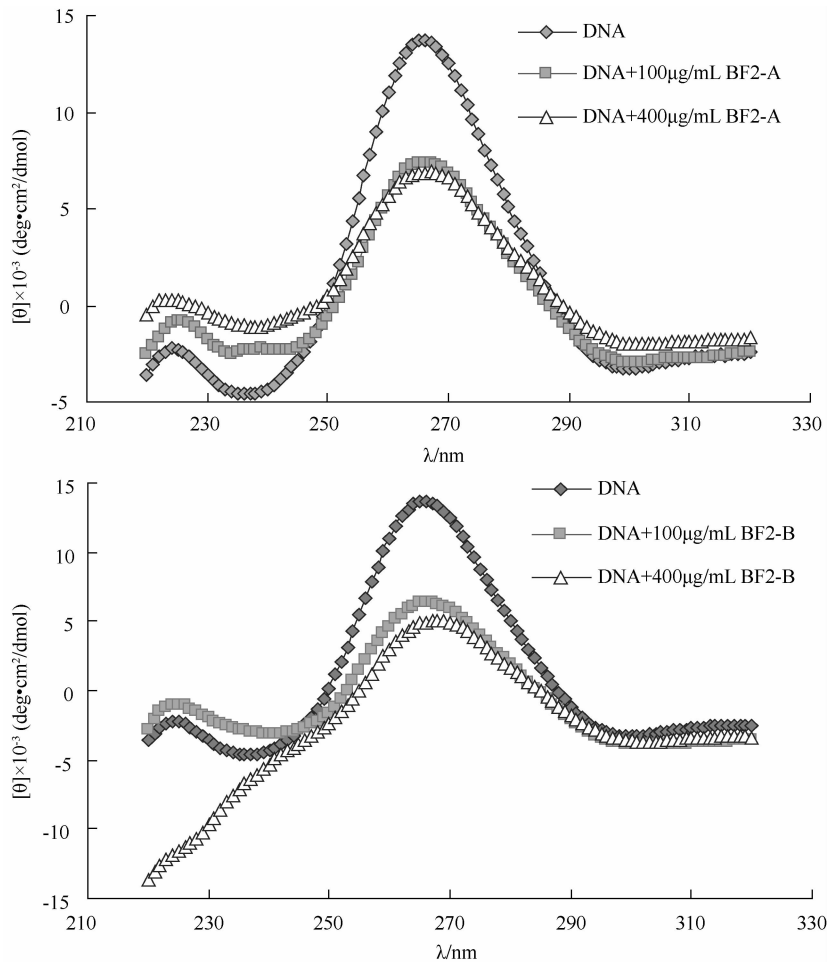


图3 抗菌肽对 DNA 结构的影响

Fig. 3 The change of DNA structure was researched by circular dichroism spectra after binding with peptides BF2-A/B with different concentration: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

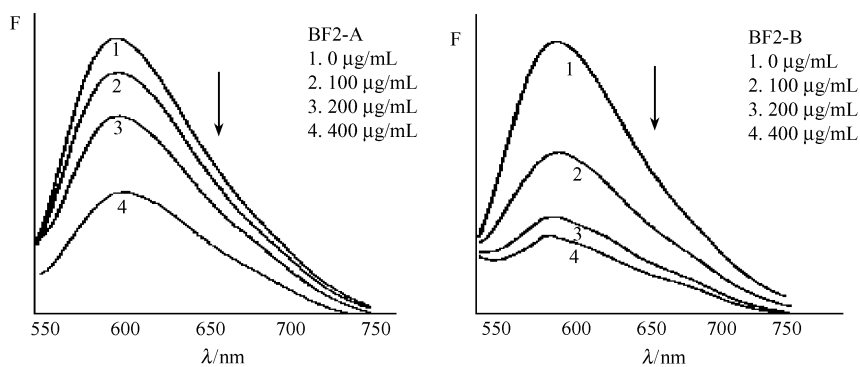


图4 抗菌肽对 EB-DNA 复合体系滴定的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of the titration of peptides BF2-A/B on EB-DNA solution with different concentration: 1. 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3. 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4. 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

系荧光强度下降幅度较 BF2-A 更大,说明了 BF2-B 嵌入 DNA 碱基对的能力更强。

## 2.5 磷酸根离子 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 对抗菌肽与 DNA 相互作用的影响

最后考察了  $\text{PO}_4^{3-}$  对抗菌肽与 DNA 相互作用

的影响。由表 2 可知,加入磷酸根后,抗菌肽-DNA-EB 体系荧光强度皆明显升高,磷酸根的加入减弱了抗菌肽对 DNA-EB 荧光的淬灭作用,即磷酸根的存在减弱了抗菌肽与 DNA 的作用。这说明 DNA 双螺旋骨架上的磷酸基团是抗菌肽与其作用的位点,阴

离子的磷酸基团与阳离子肽之间的静电相互作用提供了最初的结合动力。大量的  $\text{PO}_4^{3-}$  竞争性的结合抗菌肽,阻止或减弱了抗菌肽与 DNA 上磷酸基团的结合,使抗菌肽对 DNA-EB 荧光淬灭减弱。

表 2 磷酸根离子对抗菌肽-DNA-EB 荧光强度的影响

Table 2 The effect of  $\text{PO}_4^{3-}$  on the fluorescence intensity of the peptide-DNA-EB system

$c(\text{KH}_2\text{PO}_4)/10^{-4} (\text{mol/L})$	0	5	25	125
relative intensity of fluorescence of BF2-A /%	25.35	27.53	31.20	38.74
relative intensity of fluorescence of BF2-B /%	3.14	3.97	6.03	13.31

### 3 讨论

抗菌肽的研究有几十年的历史,而各国学者研究抑菌机理主要集中在膜作用机制上。有些抗菌肽并不破坏膜结构,而是直接穿过胞膜,作用于胞内靶点,这可能就是其胞内分子作用抑菌机制<sup>[14-15]</sup>。Bofurin II 就是这种类型的抗菌肽,它能透过细胞膜,直接作用于胞内 DNA<sup>[9]</sup>。不同于作用膜的抗菌肽, DNA 作用抗菌肽有其独特的抑菌机制,但它的具体抑菌模式仍不清楚,值得我们去深入研究。本实验室在前期的研究中,以 Bofurin II 的衍生肽 BF2-A 为母肽,在其结构特征基础上设计合成了一个新肽 BF2-B,研究发现 BF2-B 的抗菌活性比 BF2-A 强,杀菌也比 BF2-A 迅速。在研究 BF2-A/B 对细菌胞膜的作用机制时,我们发现 BF2-A 能增加大肠杆菌外膜的渗透性,但不能明显增加质膜的通透性,也不能诱导胞内的大分子外泄。流式细胞仪显示 BF2-A 处理后的细菌胞膜完整,并不被 PI 着色,并且电镜图片也显示, BF2-A 处理后的细菌细胞保持了完整。而 BF2-B 能增加大肠杆菌外膜和质膜的渗透性,甚至在 5 倍 MIC 时,还能诱导胞质内的大分子物质,例如  $\beta$ -半乳糖苷酶的轻微泄漏。电镜图片也观察到 5 倍 MIC 的 BF2-B 处理后,细菌胞内内容物的释放<sup>[11]</sup>,但流式细胞仪显示胞膜依然完整,PI 着色率极低。总体上,虽然 BF2-B 能增加细菌质膜的渗透性,但 BF2-A/B 都不破裂细胞质膜,它们可能是进入细胞质后作用胞内的大分子如 DNA。

本文选取大肠杆菌为对象,研究了衍生肽 BF2-A/B 对基因组 DNA 作用的分子机制。BF2-A/B 穿透细胞膜进入胞质后并没有断裂基因组 DNA,而是与 DNA 强烈的结合, BF2-B 结合 DNA 的能力比 BF2-A 至少强十倍。BF2-A/B 还能嵌入到 DNA 的碱基对间,插入到双螺旋沟槽中,使 DNA 的螺旋结

构变得松散。而 BF2-B 无论是嵌入碱基对还是插入沟槽的能力都比 BF2-A 强。BF2-A/B 还能与 EB 竞争性的插入到碱基对中,使 EB-DNA 复合体系荧光减弱。同时,磷酸根的加入减弱了抗菌肽对 DNA-EB 荧光的淬灭作用。

因此,我们可以推论,抗菌肽 BF2-A/B 在结合 DNA 的过程中首先是依靠自身的碱性氨基酸残基与 DNA 的酸性磷酸基团间的静电引力吸附到 DNA 链上,然后 C-端的两亲  $\alpha$ -螺旋的疏水性一面,利用疏水相互作用插入到 DNA 双螺旋内部疏水的沟槽中。BF2-A/B 的分子里都有一个苯丙氨酸,它具有一个平面苯环基团,这跟有三环平面基团的 EB 的结构很类似,因此它跟 EB 一样也有能力插入到 DNA 碱基对中。因为 BF2-A/B 的脯氨酸铰链区提供了一种易弯曲的有柔韧性的螺旋构型,使得脯氨酸旁边的苯丙氨酸有足够的机会利用疏水相互作用插入到同样疏水的碱基对中。跟 BF2-A 比起来, BF2-B 带有更多的正电荷,它与 DNA 的静电吸引力更强,而且其 C-端的两亲螺旋更完美,螺旋度更大,疏水性更强,那么它与 DNA 沟槽的疏水相互作用也更强。当更多的 BF2-B 分子结合到 DNA 上,也就有更多的苯丙氨酸有机会插入到碱基对中取代 EB,因此也解释了 BF2-B 嵌入 DNA 碱基对的能力比 BF2-A 更强的原因。总之, BF2-B 相比 BF2-A 更强的结合 DNA 的能力解释了为什么它拥有更强的抗菌活性以及更迅速的抑菌曲线。

### 参考文献

- [1] Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in *Drosophila*. *Nature*, 1972, 237:232-235.
- [2] 顾莉娟, 吴健伟, 苏晓庆, 等. 抗菌肽的研究进展. 中国生化药物杂志 (*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*), 2006, 27(6): 282-286.
- [3] Zaslof M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415:389-395.
- [4] Hancock REW, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 206:143-149.
- [5] Epanand RM, Vogel HJ. Diversity of anti microbial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica Biophysica Acta*, 1999, 1462:11-28.
- [6] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation. *Biochimica Biophysica Acta*, 2007, 1768:1160-1169.
- [7] 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 (*Progress in Biochemistry and Biophysics*), 1998,25(1): 64-67.
- [ 8 ] Park CB, Kim MS, Kim SC. A novel antimicrobial peptides from *bufo bufo gargarizans*. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 1996,218:408-413.
- [ 9 ] Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide Bufenin II: Bufenin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 1998,244:253-257.
- [10] Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, et al. Structure-activity analysis of bufenin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of bufenin II. *Proceeding of National Academy of Sciences of USA*, 2000,97: 8245-8250.
- [11] Hao G, Shi YH, Tang YL, et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Bufenin 2. *Peptides*, 2009,30:1421-1427.
- [12] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京:科学出版社, 2002.
- [13] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation. *Biochimica Biophysica Acta*, 2007,1768:1160-1169.
- [14] Kanyshkova TG, Semenov DV, Buneva VN. Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Letters*, 1999,451:235-237.
- [15] Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160:91-96.

## The action mechanism of analogues of the antimicrobial peptide Bufenin II with *E. coli* genomic DNA

Gang Hao, Yonghui Shi, Yali Tang, Guowei Le \*

(Research center of Food Nutrition and Function Factor, School of Food Science and Technology, JiangNan University, WuXi 214122, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim was to study the action mechanism of analogues BF2-A/B of the antimicrobial peptide Bufenin II with *Escherichia coli* (*E. coli*) genomic DNA. [ **Methods** ] The abruption and binding action of peptides to DNA were investigated by agarose electrophoresis and gel retardation assay, respectively. The change of DNA structure after binding with peptides was researched by circular dichroism spectra. The competitive intercalation of peptides and ethidium bromide (EB) into DNA, and the influence of phosphate anion to the interaction between peptides and DNA were analyzed by fluorescence spectra. [ **Results** ] BF2-A/B didn't breakdown the genomic DNA, but they bond to DNA. Both peptides made the two-helical structure of DNA loose, and impaired the accumulation amongst base pairs. BF2-A/B could weaken the fluorescence intensity of EB-DNA complex, which appeared to inhibit the intercalation of EB into DNA. However, the addition of phosphate anion impaired the fluorescent quenching of peptides to DNA-EB complex. [ **Conclusion** ] The initial step of peptides binding to DNA was the adhesion of basic amino acid on phosphate group depended on electrostatic attraction. Then the peptides inserted the groove of DNA duplex. The direct intercalation involving phenylalanine and nucleic acid bases participate in the peptides-DNA interaction. The stronger binding affinity of BF2-B than BF2-A attributed to more positive charge and powerful ability of intercalation into groove and base pair of DNA.

**Keywords:** antimicrobial peptide; Bufenin II; *E. coli*; genomic DNA; action mechanism

(本文责编:王晋芳)