

## 来自穿膜肽的新肽的抗菌活性及抑菌机制

李莉蓉, 施用晖, 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】研究基于穿膜肽和抗菌肽构效关系改造获得的新肽 P7 的抗菌活性及其对大肠杆菌 (*E. coli*) 的抑菌机制。【方法】微量稀释法和溶血实验分析 P7 的抑菌活性及其对正常细胞的细胞毒性; 采用膜荧光探针、流式细胞术和扫描电镜分析 P7 对 *E. coli* 膜通透性、膜完整性的影响和细胞超微结构变化; 通过激光共聚焦分析 P7 在 *E. coli* 细胞中的定位; 凝胶阻滞实验测定 P7 与 *E. coli* 基因组 DNA 结合能力。【结果】P7 比母肽显示更强的抑菌活性, 最低抑菌浓度范围为 4 - 32  $\mu\text{mol/L}$ , 且在作用浓度范围内具有较弱的溶血活性。P7 可以增加 *E. coli* 外膜和内膜的通透性, 使 *E. coli* 细胞膜的完整性和细胞表面结构受损。同时 P7 可以穿过 *E. coli* 细胞膜在细胞质聚集并与基因组 DNA 结合。【结论】P7 通过增加 *E. coli* 内外膜通透性, 穿过细胞膜与胞内 DNA 结合发挥抑菌活性。

**关键词:** 穿膜肽, 抑菌活性, DNA 结合

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 09-0950-07

食品中病原微生物污染导致的食品污染和疾病传播是危害食品安全的因子之一。防腐剂作为重要的食品添加剂在食品工业中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。随着人们生活水平的提高, 大家对食品营养、绿色、安全的需求也增加, 生物防腐剂也越来越受关注。抗菌肽是一类具有抗菌活性的小肽, 其具有高效、低毒、广谱的特性<sup>[2-3]</sup>。抗菌肽独特的优点可作为开发生物防腐剂的来源之一。穿膜肽是一类可以穿过细胞膜的一类肽的总称, 它们主要用于将蛋白、核酸、纳米材料等物质向细胞内运输, 主要用于基因治疗和药物转运<sup>[4]</sup>。抗菌肽和穿膜肽在结构上有一定的共性, 它们大都是短的正离子两亲性肽; 在膜作用机制上也有类似的作用机制, 如桶板模型、毯式模

型和环孔模型<sup>[4-6]</sup>。基于抗菌肽和穿膜肽在结构和功能上的相似性, 以穿膜肽改造获得低毒高活性的抗菌肽也就成为可能。本实验室的前期研究中, 我们以穿膜肽 ppTG20 (GLFRALLRLLRSLWRLLLRA) 为母肽, 在抗菌肽和穿膜肽结构活性基础上将 3 位的苯丙氨酸和 14 位的色氨酸用精氨酸取代, 获得一个新的衍生肽 P7 (GLRRALLRLLRSLRRLLLRA)。对它们的生物活性进行分析发现, P7 比母肽具有更强的抗菌活性和更好的细胞选择性, 其抑制沙门氏菌的活性虽然低于硫酸卡那霉素 (MIC = 1  $\mu\text{mol/L}$ ), 但与抗菌肽蜂毒素 (Melittin) 活性相当 (MIC = 4  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[7]</sup>。P7 它是否像大多数膜作用抗菌肽一样以细胞膜为靶目标还是具有穿膜肽的胞

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31172214); 国家“863 计划” (2007AA10Z325); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

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

**作者简介:** 李莉蓉 (1980 -), 女 (壮族), 广西南宁人, 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: lilirong-lily@126.com

收稿日期: 2013-01-31; 修回日期: 2013-03-12

内活性尚未清楚。本文以大肠杆菌为对象, 研究 P7 的抑菌机理, 为新型生物防腐剂的开发和研究提供参考思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 大肠杆菌 (*Escherich coli*) ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) CMCC50013、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) CMCC51302、李斯特菌 (*Listeria monocytogene*) CMCC54002 及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC29213 由无锡市疾控中心提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 抗菌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  $\geq 98\%$ ; 1-氮-苯基萘胺 (NPN) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 邻-硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷 (ONPG) 购自中国科学院上海生化所; 碘化丙啶 (PI) 购自 sigma 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 购自南京奥多福尼生物科技有限公司; 其它试剂皆为国产分析纯。Multiskan MK3 全自动酶标仪, 美国 Thermo; SpectraMax M5 荧光酶标仪, 美国 Molecular Devices; FACS Calibur 流式细胞计数仪, 美国 Becton Dickinson; S-3000N 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi; LSM710 激光共聚焦显微镜, 德国 Zeiss。

### 1.2 抗菌活性测定

用微量稀释法分析肽的最低抑菌浓度<sup>[8]</sup>。离心收集对数期菌细胞, 用 PBS 缓冲液清洗 2 遍后用新鲜 LB 培养基重悬为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液。将等体积的 100  $\mu$ L 系列稀释的肽溶液 (含 1% 的蛋白胨) 加入 96 孔酶标板中, 再加入等体积的菌悬液, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。用酶标仪测定 630 nm 下的吸光值, 细菌生长完全被抑制的最低肽浓度定义为最低抑菌浓度 (MIC)。

### 1.3 溶血活性测定

溶血活性根据 hou 等方法进行测定<sup>[9]</sup>。采集 C57BL/6 小鼠血液, 用 PBS 缓冲液洗 3 遍后重悬为 5% 的红细胞悬液。将 100  $\mu$ L 的红细胞悬液与等体积的不同浓度的肽加入 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h。取出, 4 $^{\circ}$ C,  $98 \times g$  离心 7 min。小心吸取上清于新的 96 孔板内, 用酶标仪测 595 nm 处吸光值。红细胞悬液中添加 1% 的 Triton X-100 作为最大的溶

血率。

### 1.4 肽对 *E. coli* 外膜及内膜通透性分析

用 NPN 探针分析大肠杆菌外膜通透性<sup>[10]</sup>。收集对数期 *E. coli* 细胞, 用 HEPES 缓冲液重悬为  $A_{600} = 0.4$  的浓度。在 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 的菌悬液, 加入 NPN 溶液 (终浓度为 10  $\mu$ mol/L), 最后加入 100  $\mu$ L 的肽溶液 (终浓度为 8  $\mu$ mol/L)。用荧光酶标仪记录激发波长为 350 nm、发射波长为 429 nm 下的荧光强度。

用 ONPG 荧光探针分析 *E. coli* 内膜通透性<sup>[10]</sup>。收集对数期 *E. coli* 细胞后用 M9 乳糖诱导培养基重悬于 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h。调节菌液浓度为  $A_{600} = 0.4$ 。在 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 的菌悬液, 加入 30 mmol/L 的 ONPG 10  $\mu$ L, 加入 10  $\mu$ L 的肽溶液 (终浓度为 8  $\mu$ mol/L), 与 37 $^{\circ}$ C 培养。用酶标仪测定 405 nm 处的吸光值。

### 1.5 肽对 *E. coli* 细胞膜完整性影响

根据 Joshi 等方法分析肽对 *E. coli* 细胞膜完整性的影响<sup>[11]</sup>。收集对数期 *E. coli* 细胞, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍后重悬为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液。加入肽溶液 (终浓度为 8  $\mu$ mol/L) 后混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h。加入 PI (终浓度为 10  $\mu$ g/mL) 在 4 $^{\circ}$ C 避光固定 0.5 h 后用流式细胞计数仪进行分析。

### 1.6 肽对 *E. coli* 细胞超微结构影响

$1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液与肽溶液 (终浓度为 8  $\mu$ mol/L) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h 后离心收集细胞并用 PBS 缓冲液清洗、重悬。加 5% 戊二醛固定过夜后用 PBS 磷酸缓冲液漂洗数次, 再用 1% 锇酸固定 4 h。用 PBS 缓冲液漂洗数次, 用 50%, 70%, 90%, 100% 的乙醇溶液脱水, 再用乙醇: 戊二醇为 1:2, 2:1 依次漂洗, 喷于铜网上烘干, 通过扫描电子显微镜观察。

### 1.7 肽在细胞中的定位分析

用激光共聚焦分析肽在细胞中的定位, 根据 Park 等方法稍做修饰<sup>[12]</sup>。在  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液加入 FITC 标记的肽 (终浓度为 8  $\mu$ mol/L), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h。离心收集细胞并用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 重悬。将菌液滴加在载玻片上, 封片固定, 用激光共聚焦显微镜观察。

### 1.8 肽与 DNA 的结合分析

实验根据 Imura 等方法稍做修饰<sup>[13]</sup>。将 250 ng 的 DNA 与不同浓度肽在室温下孵育 10 min, 结合体

系为12  $\mu\text{L}$ 。加入2  $\mu\text{L}$ 的上样缓冲液后用0.8%的琼脂糖电泳分析DNA迁移情况。

## 2 结果

### 2.1 肽的抑菌活性分析

以最低抑菌浓度(MIC)分析肽对5种致病菌的

抑菌活性,结果见表1。从表中可看出P7对5种致病菌有不同程度的抑菌活性且高于母肽,抑菌浓度范围为4–32  $\mu\text{mol/L}$ 。对照乳链菌肽(Nisin)对革兰氏阴性菌未显示抑菌活性,除了对金黄色葡萄球菌抑菌活性强于P7外,对其它4株致病菌的抑菌活性均小于P7。

表1. 肽对不同致病菌的最低抑菌浓度

Table 1. The minimum inhibitory concentrations of peptides against different pathogenic strains

Peptides	Minimum inhibitory concentrations / ( $\mu\text{mol/L}$ )				
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>L. monocytogene</i>	<i>S. aureus</i>
ppTG20	> 64	64	> 64	> 64	> 64
P7	8	4	8	16	32
Nisin	> 64	> 64	> 64	32	16

### 2.2 肽溶血活性分析

通过分析P7对红细胞的溶血活性来判定其对正常哺乳动物细胞的细胞毒性,结果(图1)表明在其作用浓度浓度范围内溶血活性较弱,直至400  $\mu\text{mol/L}$ 时红细胞溶血率约为32%,而对照Melittin在25  $\mu\text{mol/L}$ 时红细胞溶血率已达100%。

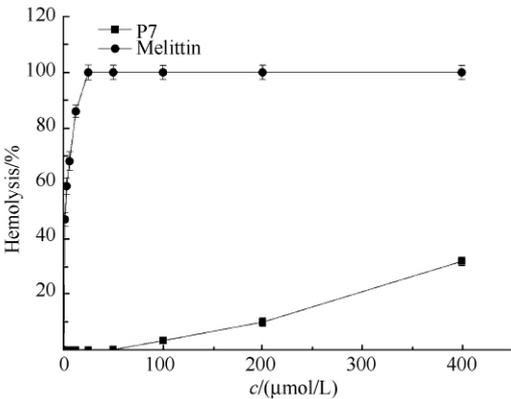


图1. 肽的溶血活性

Figure 1. Hemolytic activity of peptides. The hemolysis of Melittin (●) and P7 (■) were analyzed by determining the hemoglobin release of 5% suspensions of fresh C57BL/6 mice erythrocytes at 595 nm. Erythrocytes were incubated with different concentration of Melittin or P7 at 37°C for 30 min.

### 2.3 肽对 *E. coli* 外膜及内膜通透性影响

图2-A显示,P7与*E. coli*细胞作用后,随着时间的增加,外膜通透性增加,使得NPN进入膜的疏水环境导致荧光强度增加。而不加肽处理的阴性对照体系的荧光强度未随时间增加而增加,即细胞外

膜通透性不变。

在细胞膜的通透性改变的情况下,细胞内膜通透性探针ONPG可以迅速进入细胞内,使得反应体系OD值快速升高。故体系OD值的变化可反映细胞内膜通透性的变化情况。图2-B显示,P7与*E. coli*细胞作用后,内膜通透性随时间延长而增加;对照组的PBS缓冲液不影响*E. coli*细胞内膜通透性。膜通透性分析表明P7可以增加*E. coli*外膜和内膜的通透性。

### 2.4 肽对 *E. coli* 细胞膜完整性影响

细胞的完整性被破坏后,非通透性核酸染料PI能够进入细胞内将核酸染色。流式细胞仪可以分析被染上的细胞数。P7对*E. coli*细胞膜完整性的影响见图3。与不加肽的阴性对照(图3-A)相比,P7处理(图3-B)后约有9%的*E. coli*细胞膜完整性受损。

### 2.5 肽对 *E. coli* 细胞超微结构影响

扫描电镜分析结果表明,不加肽处理(图4-A)的*E. coli*细胞表面均一光滑,与P7孵育(图4-B)半小时后部分细胞变长,表面有褶皱和孔洞出现,即P7造成*E. coli*细胞表面结构受损。

### 2.6 肽在 *E. coli* 细胞中的定位

FITC标记的P7与*E. coli*细胞孵育半小时后,肽进入*E. coli*细胞内,聚集于细胞质(图5),提示P7作用位点主要在胞内。

### 2.7 肽与DNA结合的凝胶阻滞分析

我们用电泳迁移率对肽与DNA的结合进行定

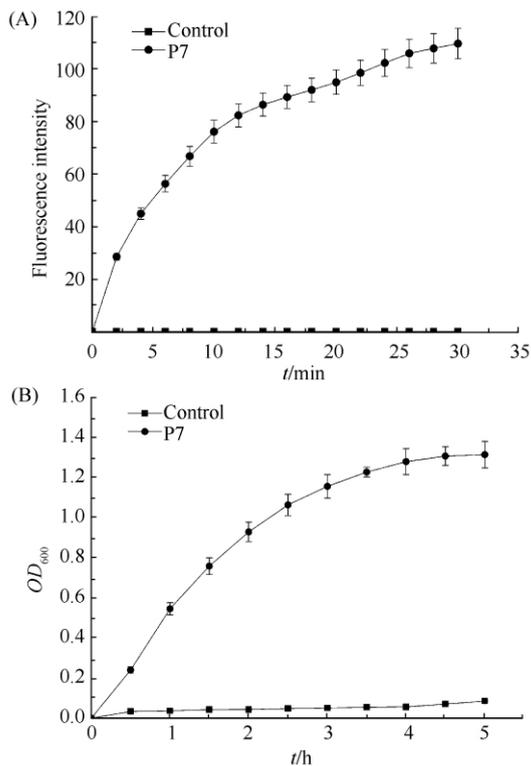


图 2. P7 对 *E. coli* 外膜和内膜通透性的影响

Figure 2. Effect of P7 on the outer membrane (A) and inner membrane (B) permeation of *E. coli* cells. The *E. coli* cells were treated with the negative control phosphate buffer saline (■) or 8  $\mu\text{mol/L}$  ( $1 \times \text{MIC}$ ) of P7 (●).

性和定量分析。若有物质与 DNA 结合,则 DNA 在电泳中的迁移就会受到影响,即与单独的 DNA 迁移相比有一定的滞后。图 6 显示,P7 和母肽 ppTG20 均可以结合 *E. coli* 基因组 DNA。在肽与 DNA 质量比为 30 的时候,ppTG20 与 DNA 强烈结合,使得 DNA 阻滞在点样孔无法向正极运动,而 P7 仅在肽与 DNA 质量比为 6 的时候就可将 DNA 阻滞在点样孔,说明 P7 与 DNA 的结合能力至少比 ppTG20 强 5 倍。

### 3 讨论

同多数抗菌肽一样,P7 对选取的 5 株食品中常见致病菌均有抑菌活性,其 MIC 值在 4–32  $\mu\text{mol/L}$  之间且抑菌活性高于母肽,说明用正电荷的精氨酸取代不带电的苯丙氨酸和色氨酸提高了母肽抑菌活性。最初被做为临床抗生素来评价的乳酸链球菌素

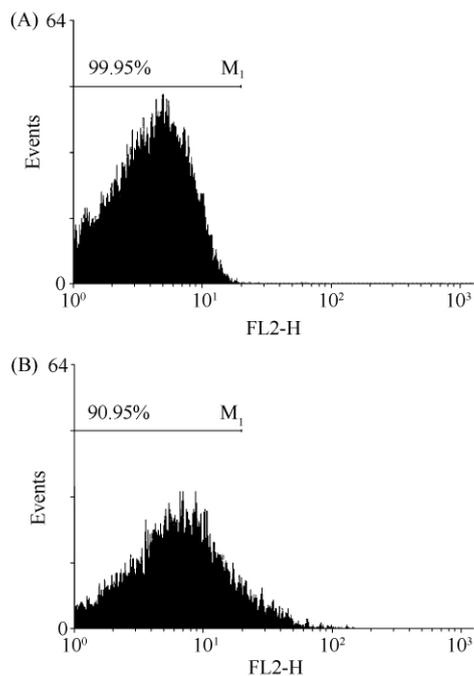


图 3. P7 对 *E. coli* 细胞膜完整性影响的流式分析

Figure 3. Effect of P7 on membrane integrity of *E. coli* cells by flow cytometry analysis. Marker1 ( $M_1$ ) is the region that the cells were intact. (A) The histogram of untreated *E. coli* cells; (B) The histogram of *E. coli* cells treated with 8  $\mu\text{mol/L}$  ( $1 \times \text{MIC}$ ) P7 for 0.5 h.

(Nisin) 是目前国内唯一获得批准用于食品加工的抗菌肽类防腐剂。Nisin 对本研究选取的革兰氏阴性菌均无抑菌活性,但对革兰氏阳性的 *L. monocytogene* 和 *S. aureus* 有明显的抑菌活性, MIC 值分别为 32  $\mu\text{mol/L}$  和 16  $\mu\text{mol/L}$ 。与 Nisin 相比,P7 对革兰氏阴性和阳性菌均显示抑菌活性,且对革兰氏阴性菌的抑菌活性强于革兰氏阳性菌,除了对 *S. aureus* 抑菌活性 (MIC = 16  $\mu\text{mol/L}$ ) 弱于 Nisin 外,对其余菌株的抑菌活性均优于 Nisin。同时红细胞溶血实验表明 P7 在活性浓度范围内溶血率小于 1%,即对正常细胞几乎无细胞毒性,说明其具有较好的细胞选择性。而具有强抑菌活性 (MIC 值为 1–4  $\mu\text{mol/L}$ ) 的典型抗菌肽 Melittin,在活性浓度范围内溶血率大于 70%,且肽浓度在 25  $\mu\text{mol/L}$  时溶血率已达 100%。P7 作为一种小肽,具有广谱抗菌活性、毒性小的优点。因此 P7 有很好的开发潜能将其运用于食品工业中辅助或代替防腐剂以防治食品中病原细菌的污染。

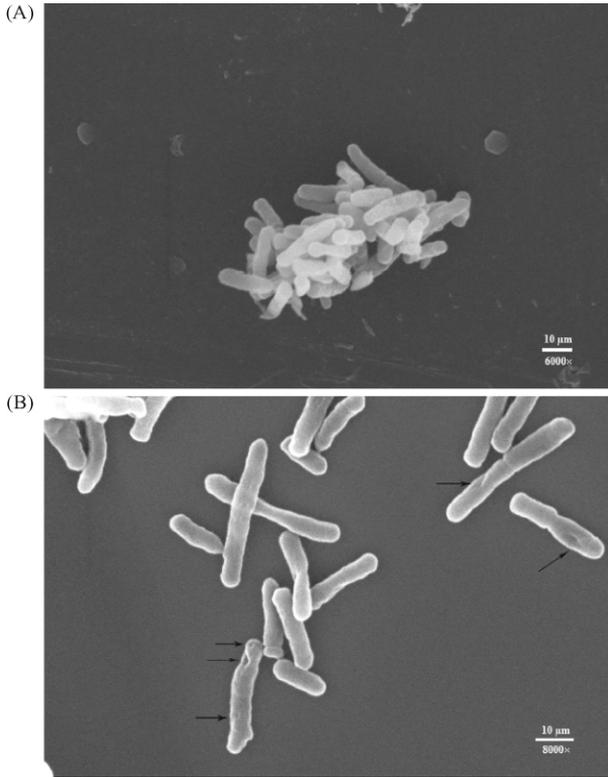


图 4. *E. coli* 细胞扫描电镜图

Figure 4. Scanning electron microscopy images of *E. coli*. (A) Untreated *E. coli* (no P7 present); (B) *E. coli* treated with 8  $\mu\text{mol/L}$  ( $1 \times \text{MIC}$ ) P7 for 0.5 h.

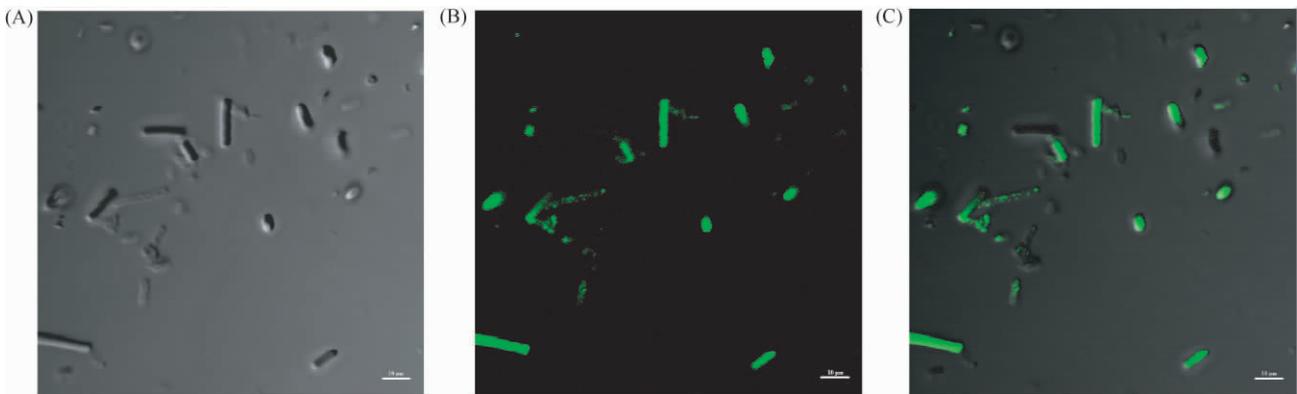


图 5. *E. coli* 细胞激光共聚焦图

Figure 5. Confocal laser-scanning microscopy images of *E. coli*. The *E. coli* cells were treated with 8  $\mu\text{mol/L}$  ( $1 \times \text{MIC}$ ) FITC-labeled P7 at 37°C for 30 min and then were visualized by confocal laser microscopy with excitation at 488 nm and a 40X lens. (A) The bright field image; (B) fluorescence image; (C) the merged image.

ppTG20 的 5 倍。增加的净电荷不但有利于 P7 与 *E. coli* 细胞表面的静电相互作用,而且也增强了它与多聚阴离子的 DNA 间的静电吸引,这是 P7 活性增强的重要原因。肽与 DNA 的作用可以阻碍或关闭一些毒力基因的表达,是一个有效的途径抑制或

抗菌肽的抑菌机制很复杂,因此阐明抗菌机理将引导有效的抗菌多肽的设计。细胞膜是细胞抵御外来侵害的首道防线也是细胞保护细胞内部结构、物质进出细胞的屏障,负责选择性渗透、细胞能量驱动等重要生理功能<sup>[14]</sup>。抗菌药物对细胞膜的损害会造成膜结构和功能完整性的损失。P7 与 *E. coli* 细胞作用后改变细胞内外膜的通透性。但进一步的分析发现 P7 与以膜损伤为主要活性机制的抗菌肽不尽相同,其虽然增加细胞膜的通透性但只造成细胞膜的部分损伤,细胞的结构仍存在,仅在细胞表面形成孔洞,即 P7 具有一定的破坏细胞膜完整性的能力,膜的损伤是其增加细胞膜通透性,在细胞形成孔洞的结果。P7 不瓦解细胞膜即可发挥抑菌活性,因此可以推论还存在其它胞内机制。已有研究表明抗菌肽 Buforin II 在不损伤细胞膜的情况下进入细胞内,与胞内核酸结合最终导致细胞死亡<sup>[15]</sup>。Magainin2 增加细胞膜的通透性,在细胞表明形成孔洞导致细胞瓦解死亡,但其有部分分子可以进入细胞内与胞内 DNA 结合<sup>[13, 16]</sup>。激光共聚焦分析表明 P7 可以穿过 *E. coli* 细胞膜,进入与胞内,这也暗示了 P7 存在胞内靶目标作用机制。凝胶阻滞分析证实 P7 具有 DNA 结合能力,其与 DNA 亲和力为

破坏细胞生命活动需要的物质的合成,最终导致细胞死亡。

总之,本实验通过对 P7 抑菌机制的分析发现 P7 发挥抑菌作用时先与细菌细胞表面结合,增加细胞膜的通透性,使得细胞膜完整性受损。P7 穿过细

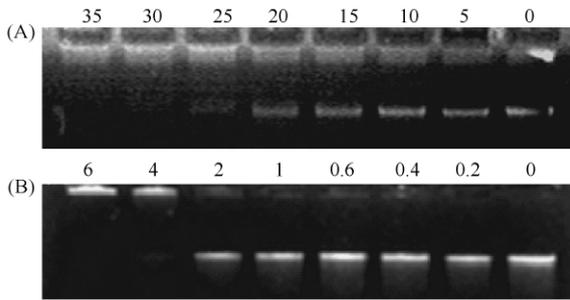


图 6. 肽与 *E. coli* 基因组 DNA 结合的凝胶阻滞电泳图

Figure 6. Gel retardation assays of peptides binding *E. coli* genomic DNA. Various amounts of ppTG20 (A) or P7 (B) were incubated with 250 ng of *E. coli* genomic DNA and the DNA binding affinity was assessed by the inhibition of the electrophoretic migration of DNA by the peptides. The weight ratio (peptide: DNA) is indicated above each lane.

胞进入细胞内部后与 DNA 结合, 最终导致细胞死亡。

## 参考文献

- [1] Lundberg P, Langel Ü. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *Journal of Molecular Recognition*, 2003, 16 (5) : 227-233.
- [2] Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 2010, 6 (10) : e1001067.
- [3] Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2011, 1816 (2) : 232-246.
- [4] Delcroix M, Riley LW. Cell-penetrating peptides for antiviral drug development. *Pharmaceuticals*, 2010, 3 (3) : 448-470.
- [5] Splith K, Neundorf I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal*, 2011, 40 (4) : 387-397.
- [6] Henriques ST, Melo MN, Castanho MARB. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochemical Journal*, 2006, 399 (1) : 1-7.
- [7] Li LR, Shi YH, Su GF, Le GW. Selectivity for and destruction of *Salmonella typhimurium* via a membrane

damage mechanism of a cell-penetrating peptide ppTG20 analogue. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 40 (4) : 337-343.

- [8] Yang ST, Shin SY, Hahm KS, Kim JI. Design of perfectly symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, 27 (4) : 325-330.
- [9] Hou F, Li J, Pan P, Xu J, Liu L, Liu W, Song B, Li N, Wan J, Gao H. Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38 (6) : 510-515.
- [10] Ibrahim HR, Sugimoto Y, Aoki T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2000, 1523 (2-3) : 196-205.
- [11] Joshi S, Bisht GS, Rawat DS, Kumar A, Kumar R, Maiti S, Pasha S. Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and *E. coli* ATCC 11775. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2010, 1798 (10) : 1864-1875.
- [12] Park, CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244 (1) : 253-257.
- [13] Imura Y, Nishida M, Matsuzaki K. Action mechanism of PEGylated magainin 2 analogue peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembrane*, 2007, 1768 (10) : 2578-2585.
- [14] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 2003, 55 (1) : 27-55.
- [15] Kobayashi S, Chikushi A, Tougu S, Imura Y, Nishida M, Yano Y, Matsuzaki K. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 2004, 43 (49) : 15610-15616.
- [16] Matsuzaki K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1376 (3) : 391-400.

# Antibacterial activity and mechanisms of a new peptide derived from cell-penetrating peptide

Lirong Li, Yonghui Shi, Guowei Le\*

Institute of Food Nutrition and Safety, school of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** [Objective] We studied the antibacterial activities and mechanism of a new peptide P7, according to the structure-activity relationships of cell-penetrating peptide and antimicrobial peptide. [Methods] The antimicrobial activities and cytotoxicity of P7 were examined using the microdilution and hemolysis analysis. The effects of P7 on the outer and plasma membrane permeability, membrane integrity and morphology of *E. coli* cells were analyzed by the membrane fluorescent probe, flow cytometry and scanning electron microscopy. Localization of the P7 onto the *E. coli* cells was determined by using a confocal laser-scanning microscopy. The DNA binding activity of P7 was evaluated by electrophoretic mobility shift assay. [Results] P7 possessed stronger antimicrobial activity than ppTG20. The inhibitory concentration was in the range from 4 to 32  $\mu\text{mol/L}$  where P7 shown low hemolysis. P7 could increase the outer and plasma membrane permeability, induce the cell membrane integrity loss and cells structure damage. P7 penetrated the cell membrane, accumulated inside the cytoplasm and interacted with DNA. [Conclusion] P7 exerted its antibacterial activity by increasing cell membrane permeability, penetrated the cell membrane and binding to DNA.

**Keywords:** Cell-penetrating peptide, antibacterial activities, DNA-binding

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31172214), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA10Z325) and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

\* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-510-85917789; E-mail: lgw@jiangnan.edu.cn

Received: 31 January 2013 / Revised: 12 March 2013

## 《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。