

## • 医药生物技术 •

# 东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 的结构预测及生物学活性分析

刘悦, 邵学超, 王天添, 王鑫莹, 李南, 赵云冬, 夏薇, 孙丽媛

北华大学 医学技术学院, 吉林 吉林 132013

刘悦, 邵学超, 王天添, 等. 东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 的结构预测及生物学活性分析. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2890-2902.

Liu Y, Shao XC, Wang TT, et al. Structure prediction and biological activity analysis of dybowskin-1ST antimicrobial peptide in *Rana dybowskii*. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2890-2902.

**摘要:** 运用生物信息学方法进行东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 的进化、结构及抗原表位预测, 分析其抑菌机理及结构性质, 应用小鼠伤口愈合实验及体外抑菌实验进行活性验证。同时为改良亲本肽、进行新型衍生肽的研发提供理论基础。使用软件 MEGA\_X 对 dybowskin-1ST 及其他蛙类抗菌肽进行同源性比对并绘制系统进化树; 通过在线软件 ProtParam、ProtScale、PeptideCutter、SignalP、TMHMM Server 分别预测抗菌肽 dybowskin-1ST 的理化参数、亲/疏水性、剪切位点、信号肽及跨膜区域; 分别应用 SOPMA、Jpred4 及 DNASTAR Protean 软件多重分析预测 dybowskin-1ST 的二级结构, 利用 SWISS-MODEL 和 I-TASSER 软件进行三级结构预测。通过在线软件 ABCpred 和 SYFPEITHI 进行 T/B 抗原表位预测。构建小鼠伤口模型, 观察 dybowskin-1ST 促进伤口愈合活性。应用纸片法及 96 孔板法, 确定 dybowskin-1ST 的抑菌活性。抗菌肽 dybowskin-1ST 含有 59 个氨基酸, 其中亮氨酸占 16.9%, 分子式为  $C_{318}H_{510}N_{80}O_{93}S_2$ , 理论等电点为 5.10, 电荷量为 -2。抗菌肽 dybowskin-1ST 与东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1CDYa 亲缘较近。三种方法二级结构预测结果相似, dybowskin-1ST 中  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规卷曲, 所占比例分别为 44.07%、16.95%、3.39%、35.39%。三级结构预测中显示该抗菌肽大部分为  $\alpha$ -螺旋结构, 抗菌肽 dybowskin-1ST 总体预测为亲水性蛋白, 具有信号肽序列。亚细胞定位分析显示, 其分泌线粒体靶向肽的可能性为 0.944。该蛋白属于膜外蛋白, 无跨膜结构区, 有 7 个磷酸化位点, 3 个 T 细胞抗原表位和 8 个 B 细胞抗原表位。dybowskin-1ST 具有促进伤口愈合的作用, 能够有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活性, 但对真菌及耐药菌的抑菌活性有限。dybowskin-1ST 结构中虽富含  $\alpha$ -螺旋, 但验证实验表明其抑菌能力仍有待加强, 原因可能是由于其带负电荷且为亲水性蛋白, 以提高正电荷数及改变疏水性为基本思路进行氨基酸改造可获得活性升级的衍生肽。

**关键词:** 林蛙, 抗菌肽, 生物信息学, 伤口愈合, 抑菌作用

**Received:** September 5, 2020; **Accepted:** January 5, 2021

**Supported by:** Jilin Province's Science and Technology Development Project, China (Nos. 20190301014NY, 20190304115YY), The "13th Five-Year" Science and Technology Project of Jilin Provincial Education Department, China (No. JJKH20190657KJ), Graduate Innovation Program of Beihua University, China (No. 2019015).

**Corresponding author:** Liyuan Sun. Tel/Fax: +86-18604498551; E-mail: jlsunliyuan@163.com

吉林省科技发展计划项目 (Nos. 20190301014NY, 20190304115YY), 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目 (No. JJKH20190657KJ), 北华大学研究生创新项目 (No. 2019015) 资助。

网络出版时间: 2021-02-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210205.1626.001.html>

# Structure prediction and biological activity analysis of dybowskin-1ST antimicrobial peptide in *Rana dybowskii*

Yue Liu, Xuechao Shao, Tiantian Wang, Xinying Wang, Nan Li, Yundong Zhao, Wei Xia, and Liyuan Sun

School of Medicine, Beihua University, Jilin 132013, Jilin, China

**Abstract:** The evolution, structure and antigenic epitopes prediction of *Rana dybowskii* antimicrobial peptide dybowskin-1ST were carried out using bioinformatics software available online. Its antibacterial mechanism and structural properties were analyzed, and its activity was verified by applying wound healing assay in mice and bacteriostatic assay in vitro. This provides the theoretical basis for the improvement of parental peptide and the development of novel derivative peptides. The software MEGA\_X were used to conduct homology alignment and to construct a phylogenetic tree. The online software ProtParam, ProtScale, PeptideCutter, signal, TMHMM Server were respectively used to predict the physicochemical parameters, hydrophilia/hydrophobicity, shear sites, signal peptides, and transmembrane domains of dybowskin-1ST. The online software SOPMA, Jpred4, DNASTAR Protean were used to predict the secondary structure of dybowskin-1ST, and SWISS-MODEL, I-TASSER were used to predict the tertiary structure. ABCpred and SYFPEITHI were respectively used to predict its B- and T-cell epitopes. The effect of dybowskin-1ST on the wound healing was observed on experimental mice. Kirby-Bauer method and dilution method were used to determine the bacteriostatic activity of dybowskin-1ST. The dybowskin-1ST consists of 59 amino acid residues, of which leucine accounts for 16.9%, with a molecular formula of  $C_{318}H_{510}N_{80}O_{93}S_2$ . Its theoretical isoelectric point is 5.10 and the charge is -2. The dybowskin-1ST and dybowskin-1CDYa are closely related phylogenetically. The secondary structure of dybowskin-1ST predicted by the three methods were similar, which consisted of  $\alpha$ -helix (44.07%), extended strand (16.95%),  $\beta$ -turns (3.39%), and random coil (35.39%). The prediction of tertiary structure showed that dybowskin-1ST was mainly composed of  $\alpha$ -helix, and it was regarded as a hydrophilic protein with signal peptide sequence. Subcellular localization analysis showed that the probability of secreting the mitochondrial targeted peptides was 0.944. Dybowskin-1ST is an extracellular protein with no transmembrane structure region, but contains seven phosphorylation sites, three T-cell epitopes and eight B-cell epitopes. The dybowskin-1ST promoted wound healing and effectively inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. However, it had limited antibacterial activity against fungi and drug-resistant bacteria. Although the structure of dybowskin-1ST is rich in  $\alpha$ -helix, the verification experiments showed that its antibacterial ability needs to be enhanced. The reason may be that it is a negatively charged and hydrophilic protein, and amino acid modification with the aim of increasing the number of positive charges and changing the hydrophobicity may be used to obtain derived peptides with enhanced activity.

**Keywords:** *Rana*, antimicrobial peptide, bioinformatics analysis, wound healing, bacteriostasis

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是一类小型阳离子两亲肽, 可由各种动物、昆虫和植物体产生<sup>[1]</sup>。大部分对抗菌肽作用机制的研究表明, 抗菌肽可以整合并渗透入微生物膜, 发挥抑菌作用<sup>[2]</sup>, 不易产生耐药性, 且抗菌谱广<sup>[3]</sup>。近年来, 抗菌肽被广泛认为是最有潜力的抗生素替代药物<sup>[4]</sup>。同时, 研究认为<sup>[5]</sup>抗菌肽能够与核糖体结合, 干扰细菌蛋白质合成过程。两栖类动物的皮肤分泌物因其独特的化学性质和生物合成途径以及潜在的临床应用价值而备受关注<sup>[6]</sup>。东北林

蛙作为典型的两栖动物, 在我国东北及邻近地区广泛分布, 具有重要的药用价值<sup>[7]</sup>。dybowskin-1ST 是由林蛙皮中提取的具有 59 个氨基酸残基的抗菌肽, 它能够抑制革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌的生长, 同时具有促进伤口愈合、抗病毒等作用<sup>[8-12]</sup>。

抗菌肽的基本结构为多肽链, 氨基酸序列决定其理化性质及二级结构等因素, 从而决定抗菌肽抑菌活性。Wang 等<sup>[13]</sup>的研究中用精氨酸取代赖氨酸可增强抗菌肽的抑菌活性, 拓宽其抗菌谱。然而, 移除抗菌肽 Bac7<sup>[14]</sup>N-端的两个精氨酸残基

使其大部分抑菌活性丧失。没有根据地进行氨基酸替换、抗菌肽合成、抑菌性能验证,会造成时间及成本损耗。应用生物信息学方法,对氨基酸序列进行有关抑菌性能的参数预测,对于进一步了解抗菌肽的活性及作用机理具有重要意义。本文对东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 的理化性质、二级结构、磷酸化位点、疏水性、剪切位点等特征进行分析,并构建林蛙抗菌肽的系统发育树,同时对东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 的生物学活性进行实验验证,以期深入理解抗菌肽 dybowskin-1ST 的抑菌机制,为进行下一步蛋白质改造提供可行思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 dybowskin-1ST 抗菌肽

从 NCBI 中下载东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 序列,基因 ID: GU249565.1,蛋白 ID: ADC54260.1。其氨基酸序列为 MFTLKKSLLLLFF LGTISLSLCEEERNAEEERRDYPEERDVEVEKR IIPPLPGYFAKKT。实验用 dybowskin-1ST 抗菌肽(纯度 95%),由上海楚肽生物科技有限公司合成。

### 1.2 实验动物

北华大学实验动物中心提供 30 例 SPF 级 KM 小鼠,随机将其分为观察组、对照组,其中观察组有小鼠 20 只,平均体重 ( $26.7 \pm 9.6$ ) g。对照组小鼠 10 只,平均体重 ( $27.3 \pm 9.4$ ) g。两组小鼠均为雄性,性别、体重等组间数据差异不显著。

### 1.3 菌种

大肠埃希菌 ATCC 43889、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、白假丝酵母菌 ATCC 90028、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104,由中国科学院微生物研究所提供。

### 1.4 试剂及器材

8 mm 口径小鼠皮肤打孔器,薇婷脱毛膏,创可贴, LB 培养基(购于青岛海博生物技术有限公司),四环素纸片(购于比克曼生物科技有限公司)。

## 1.5 dybowskin-1ST 生物信息学预测

### 1.5.1 构建 dybowskin-1ST 系统发育树

利用 MEGA\_X 对东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST (GenBank 登录号: GU249565.1) 与黑龙江林蛙抗菌肽 Temporin-AM (GenBank 登录号: JF922737.1、JF922736.1)、Amurin-3 (GenBank 登录号: AM233687.1)、北美豹蛙抗菌肽 Temporin-1P (GenBank 登录号: AM493728.1)、湿地林蛙抗菌肽 Temporin H (GenBank 登录号: Y09394.1)、Temporin B (GenBank 登录号: Y09393.1)、东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1CDYa (GenBank 登录号: EU827807.1)、福建大头蛙抗菌肽 Limnonectin-1Fb (FR733639.1)、Limnonectin-1Fa (GenBank 登录号: FR733638.1)、花臭蛙抗菌肽 Brevinin-1S (GenBank 登录号: AJ971790.1)、沼泽林蛙抗菌肽 Brevinin-1 PLc (GenBank 登录号: AM745088.1) 进行同源性比对,并绘制系统进化树。

### 1.5.2 dybowskin-1ST 理化性质预测

利用专门收录抗菌肽的数据库 APD 中进行抗菌肽生物信息学分析的网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/>) 上的 ProtParam 软件进行蛋白质结构预测,此方式可得到其相关理化参数及疏水性,理化参数包括:理论等电点、分析氨基酸及原子组成、半衰期、GRAVY 指数 (Grand average of hydropathicity)、脂溶性指数、不稳定指数等。

### 1.5.3 dybowskin-1ST 疏水性预测

利用抗菌肽生物信息学分析的网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/>) 中 ProtScale 软件分析 dybowskin-1ST 的疏水性。

### 1.5.4 dybowskin-1ST 剪切位点预测

利用抗菌肽生物信息学分析的网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/>) 中 PeptideCutter 软件预测各胰蛋白酶及其他酶类物质作用于 dybowskin-1ST 的潜在剪切位点。

### 1.5.5 dybowskin-1ST 信号肽剪切位点及亚细胞定位预测

为了在各种系统中表达抗菌肽,需要进行信号肽

的预测。基因翻译需经过信号肽分拣、运输、定位。信号肽用来引导蛋白质从胞浆进入内质网、线粒体、叶绿体及核内。信号肽引导的新生多肽可通过内质网膜进入腔内,最终到达胞外。信号肽通常从合成后的蛋白质被信号肽酶水解而被除去。本研究使用 SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行信号肽检测。同时应用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php>) 进行抗菌肽的亚细胞定位分析。

### 1.5.6 dybowskin-1ST 的跨膜区预测

生物体内的蛋白质中,20%–30%都属于膜蛋白,因此膜蛋白在细胞的功能中占据重要地位。然而,对膜蛋白进行多系统表达,存在一定的难度。跨膜区域通常由有极性的  $\alpha$ -螺旋构成,在细胞中常执行信号传导或转运通道的功能。对抗菌肽的多肽链的跨膜区域进行预测,能够对其异源表达提供指导作用。本研究使用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 dybowskin-1ST 的跨膜区进行预测。

### 1.5.7 dybowskin-1ST 磷酸化位点预测

磷酸化是重要的蛋白质翻译后修饰之一,本研究运用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测 dybowskin-1ST 磷酸化位点。

### 1.5.8 dybowskin-1ST 二级结构预测

二级结构一般是抗菌肽抑菌活性的表达区域,二级结构组成在抗菌肽构成细菌膜孔的过程中起决定性作用。Lv 等<sup>[15]</sup>的研究表明猪抗菌肽 PMAP-36 的  $\alpha$ -螺旋区域结构为与细菌膜相互作用的多肽区。相关研究表明<sup>[16]</sup>, $\beta$ -折叠中包含的半胱氨酸能够形成二硫键,稳定抗菌肽构象。本研究采用 ExPASy 的 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))、Jpred4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4>) 和 DNASTar Protean 分别分析抗菌肽 dybowskin-1ST 的二级结构,多重预测其潜在抑菌性能。

### 1.5.9 dybowskin-1ST 三级结构预测

用在线建模软件 SWISS-MODEL (<https://>

[swissmodel.expasy.org/](https://swissmodel.expasy.org/)) 及穿线法在线结构预测软件 I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 预测抗菌肽 dybowskin-1ST 的三级结构。

## 1.6 dybowskin-1ST 的伤口愈合作用

### 1.6.1 分组及建立皮肤伤口模型

实验组 (dybowskin-1ST), 对照组 (甘油 80%)。小鼠背部涂抹脱毛膏停留 5 min, 刮去小鼠背部毛, 蒸馏水清洗后用 75%乙醇棉球擦洗皮肤消毒。无菌条件下用小鼠皮肤打孔器在小鼠背部制造两个直径为 8.0 mm 圆形创面 (去除全层皮肤)。

### 1.6.2 创面处理

伤口模型建立后,用打孔器在创可贴上打出相同大小的孔,用剪刀稍稍扩大创可贴开口面积使其粘贴于小鼠创口周围,局部固定小鼠伤口周围皮肤,使皮肤不易滑动,使得小鼠皮肤伤口的愈合只能靠细胞再生实现。用无菌棉球清理小鼠创口处血污,分别用 80%甘油、dybowskin-1ST (1 500 mg/L)、生理盐水以 0.1 mL/只的剂量涂抹于相应组小鼠的创口处,实验组小鼠左侧伤口涂抹 dybowskin-1ST,右侧伤口涂抹生理盐水;对照组小鼠左侧伤口涂抹 80%甘油,右侧伤口涂抹生理盐水。自然暴露创口,每天定时用药 1 次,连续用药 15 d,观察记录创口愈合情况。

## 1.7 dybowskin-1ST 体外抑菌实验

### 1.7.1 菌种活化

配置 1 mL 液体培养基:取 10  $\mu$ L 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌、铜绿假单胞菌在 37  $^{\circ}$ C 下摇床过夜培养 12–15 h,使其浊度对应 0.5 麦氏比浊,应用生理盐水将上述菌液稀释 100 倍,使其含菌量在  $(1\times 10^5-1\times 10^6)$  cfu/mL 左右,备用。

### 1.7.2 纸片法抑菌实验

将空白纸片浸润于 100 mg/L 的 dybowskin-1ST 中,取出后去除其多余水分,得到浓度约为 100 mg/L 的 dybowskin-1ST 纸片。菌液混匀后,

用棉签蘸取均匀涂布于 LB 固体培养基表面。以四环素纸片为阳性对照, 将 100 mg/L 的 dybowskin-1ST 纸片与四环素纸片放置于平板培养基适当位置, 每组实验重复 2 次。将平板置 37 °C 培养箱中静置过夜培养 8 h 后, 取出, 观察结果。

### 1.7.3 dybowskin-1ST 最低抑菌浓度 (MIC) 测定

采用微量肉汤稀释法测定 dybowskin-1ST 及庆大霉素对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)。在 96 孔板的每个对应孔中加入 100  $\mu$ L 稀释好的菌液 ( $1 \times 10^6$  CFU/mL), dybowskin-1ST (1.5 mg/mL–0.09375 mg/mL) 及庆大霉素 (128  $\mu$ g/mL–0.25  $\mu$ g/mL) 药液倍比稀释后加入 100  $\mu$ L, 放置在 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h。次日取出 96 孔板, 以小孔内完全抑制细菌生长的最小药物浓度为该药的 MIC 值。分别设置菌液阳性对照及生理盐水阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌肽 dybowskin-1ST 基因序列同源性比对及系统进化树

通过 MEGA\_X 进行同源性比对, 结果如图 1 所示, 东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1ST 与黑龙江林蛙抗菌肽 Temporin-AM、Amurin-3、北美豹蛙抗菌肽 Temporin-1P、湿地林蛙抗菌肽 Temporin H、Temporin B、东北林蛙抗菌肽 Dybowskin-1CDYa、福建大头蛙抗菌肽 Limnonectin-1Fb、Limnonectin-1Fa、花臭蛙抗菌肽 Brevinin-1S、沼泽林蛙抗菌肽 Brevinin-1 PLC 的参考序列, 同源性均在 80.00% 左右, 其中与东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1CDYa 的同源性最高, 为 94.97%。其次是与湿地林蛙抗菌肽 Temporin B 的同源性较高, 为 81.99%。系统进化树分析结果如图 2 所示, 抗菌肽 dybowskin-1ST 与东北林蛙抗菌肽 dybowskin-1CDYa 位于同一分支上, 具有较近的亲缘关系。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	100	92.68	77.08	76.27	75.00	73.66	82.59	83.90	79.82	86.69	78.62	77.09	1 Temporin H
2	92.68	100	76.09	74.29	72.24	73.80	83.51	86.23	81.99	81.88	76.49	75.00	2 Temporin B
3	77.08	76.09	100	81.95	81.68	69.20	89.53	81.88	79.52	79.94	77.63	76.27	3 Amurin-3
4	76.27	74.29	81.95	100	94.24	68.65	80.08	80.38	77.34	77.98	82.17	78.29	4 Temporin-AM1
5	75.00	72.24	81.68	94.24	100	67.86	79.69	78.21	77.08	77.09	79.46	75.58	5 Temporin-AM2
6	73.66	73.80	69.20	68.65	67.86	100	73.52	76.45	78.68	78.09	75.00	73.50	6 Brevinin-1 PLC
7	82.59	83.51	79.53	80.08	79.69	73.52	100	82.37	78.69	80.46	80.41	76.98	7 Temporin-1P
8	83.90	86.23	81.88	80.38	78.21	76.45	82.37	100	94.97	83.06	79.51	78.12	8 Dybowskin-1CDYa
9	79.85	81.99	79.52	77.34	77.08	78.68	78.69	94.97	100	79.80	77.46	76.76	9 Dybowskin-1ST
10	86.69	81.88	79.94	77.98	77.09	78.07	80.46	83.06	79.80	100	80.67	78.00	10 Brevinin-1S
11	78.62	76.49	77.63	82.17	79.46	75.00	80.41	79.51	77.46	80.67	100	93.31	11 Limnonectin-1Fa
12	77.09	75.00	76.27	78.29	75.58	73.50	76.98	78.12	76.76	78.00	93.31	100	12 Limnonectin-1Fb
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

图 1 Dybowskin-1ST 与其他蛙类抗菌肽核苷酸序列的同源比对

Fig. 1 Homology alignment of nucleotide sequences of dybowskin-1ST with other antibacterial peptides of *Rana*.

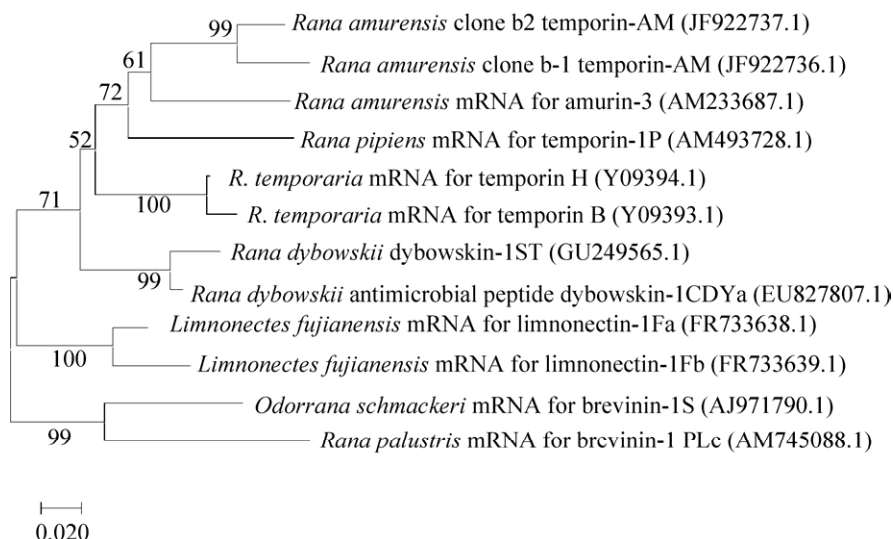


图2 Dybowskin-1ST 与其他蛙类抗菌肽的系统发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of dybowskin-1ST and other antibacterial peptides of *Rana*.

## 2.2 理化性质预测结果

经 ProtParam 分析, 抗菌肽 dybowskin-1ST 中含 59 个氨基酸残基, 分子式为  $C_{318}H_{510}N_{80}O_{93}S_2$ , 总原子数为 1 003。dybowskin-1ST 氨基酸序列组成分析见图 3。dybowskin-1ST 疏水性氨基酸占总氨基酸的 38.98%。抗菌肽的杀菌活性与疏水性呈正相关, 但疏水性氨基酸的占比并不决定整个抗菌肽的疏水性, 只能起到一定的参考作用。其他参数如分子量、等电点、带电氨基酸数目、半衰期、稳定性、疏水性和亲水性信息见表 1。当不稳

定指数大于 40 时, 说明蛋白不稳定。多肽中脂肪族氨基酸丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的含量可以决定其脂溶性指数<sup>[17]</sup>。脂肪指数反映了蛋白质和多肽的热稳定性, 同时可以决定疏水面的深度, 从而影响抗菌肽疏水性<sup>[13]</sup>。从检测结果可以看出 dybowskin-1ST 的热稳定性较好, 半衰期较长。一般来说, 亲水性平均系数 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 取值在 -2 到 +2 之间, 负值表明为亲水性蛋白。该抗菌肽 GRAVY 为 -0.358, 表明该蛋白亲水性较强。

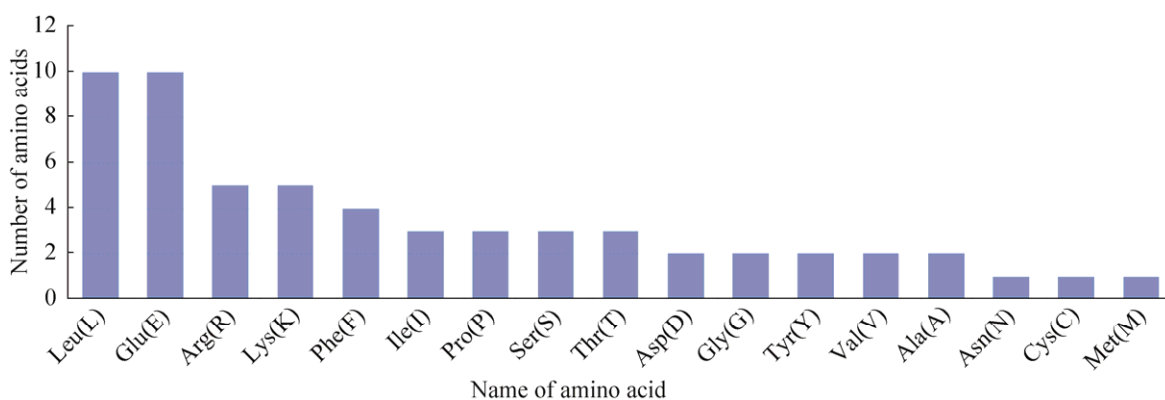


图3 Dybowskin-1ST 氨基酸组成分析

Fig. 3 Amino acid composition of dybowskin-1ST.

表 1 Dybowskin-1ST 理化性质分析结果

Table 1 Physical and chemical properties of dybowskin-1ST predicted by ProtParam

Physical and chemical properties	Parameter
Number of amino acids	59.000
Molecular weight/Da	7 006.150
pI	5.100
Total number of negatively charged residues	12.000
Total number of positively charged residues	10.000
Estimated half-life in mammalian reticulocytes, <i>vitro</i> /h	30.000
Estimated half-life in yeast, <i>vivo</i> /h	>20
Estimated half-life in <i>Escherichia coli</i> , <i>vivo</i> /h	>10
Instability index	58.280
Aliphatic index	99.150
GRAVY	-0.358

### 2.3 疏水性预测结果

通过 ProtScale 工具在线分析发现 (本实验使用 Kyte 和 Doolittle 等计算出的氨基酸疏水参数预测抗菌肽的疏水性), dybowskin-1ST 的最大疏水指数为 2.689, 位于第 13 位氨基酸, 最小疏水指数为-3.378, 位于第 35 位氨基酸, 见图 4。根据图 4 可知, dybowskin-1ST 多肽链两端显示为亲水性, 且总体亲水性要大于疏水性, 预测为亲水性蛋白, 与理化性质分析结果一致。

### 2.4 剪切位点预测结果

通过 PeptideCutter 软件分析得出,

dybowskin-1ST 中的大多数氨基酸位点可分别被 18 种活性物质剪切 (表 2), 其中被剪切可能性

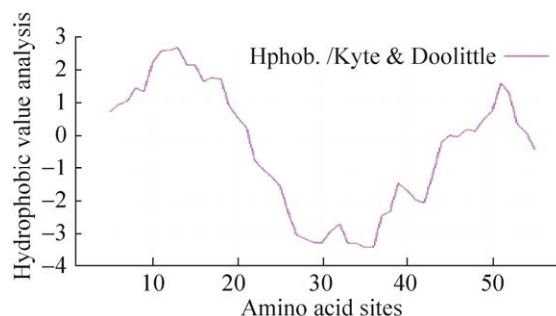


图 4 Dybowskin-1ST 疏水性预测

Fig. 4 Prediction of the hydrophobicity of dybowskin-1ST.

表 2 Dybowskin-1ST 剪切位点预测

Table 2 The predicted shear sites of dybowskin-1ST

Name of enzymes	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Proteinase K	36	2 3 4 8 9 10 11 12 13 14 16 17 19 21 23 24 25 28 29 30 31 35 37 38 41 42 43 44 47 48 50 52 54 55 56 59
Pepsin (pH>2)	18	1 2 3 4 9 10 11 12 13 14 18 19 20 21 51 53 54 55
Thermolysin	17	1 3 7 8 9 10 11 12 13 16 18 20 27 46 51 54 55
Trypsin	17	1 3 7 8 9 10 11 12 13 16 18 20 27 46 51 54 55
Pepsin (pH1.3)	17	1 2 3 4 9 10 11 12 13 14 18 19 20 21 51 54 55
Chymotrypsin-low specificity	15	1 2 4 8 9 10 11 12 13 14 19 21 52 54 55
Asp-N endopeptidase+N-terminal Glu	12	22 23 24 28 29 30 33 36 37 39 41 43
Glutamyl endopeptidase	10	23 24 25 29 30 31 37 38 42 44
Chymotrypsin-high specificity	5	2 12 13 54 55
Clostripain	5	26 32 33 39 46
LysC	5	5 6 45 57 58
LysN	5	4 5 44 56 57
Staphylococcal peptidase I	5	23 29 37 42 44
Arg-C proteinase	5	26 32 33 39 46
Formic acid	2	34 40
Asp-N endopeptidase	2	33 39
CNBr	1	1
NTCB	1	21



最大的位点集中在多肽链两端, 分别是第 1、9、10、54、55 位氨基酸。在上文疏水性分析中得知, dybowskin-1ST 两端大多显示出亲水性, 亲水性区域的稳定性较弱, 因此此处氨基酸位点较易被剪切。另外, 剪切位点较多的酶主要有蛋白酶 K、胃蛋白酶 (pH>2)、嗜热菌蛋白酶、胃蛋白酶 (pH 1.3)。

## 2.5 信号肽剪切位点及亚细胞定位预测结果

经 SignalP-5.0 分析, 该抗菌肽可能存在信号肽区域。如图 5 所示, X 轴为 dybowskin-1ST 蛋白序列的 59 个氨基酸残基; Y 轴表示各参数的数值; C 值表示剪切位点存在可能性, 为图中红线所示; S 值为信号肽存在可能性, 为图中绿线所示; Y 值是结合 S 值和 C 值进行综合分析给出的值, 为图中蓝线所示。据预测结果显示, C 值最大值在第 27–28 位氨基酸残基, 在此区域最有可能出现剪切位点, 其次为 19 位氨基酸。综合 Y 值和 S 值, S 值超过阈值 0.5, 而 Y 值未超过, 表明抗菌肽 dybowskin-1ST 可能具有信号肽。dybowskin-1ST 亚细胞定位分析显示, 分泌通路信号肽的可能性为 0.024, 线粒体靶向肽的可能性为 0.944, 其他蛋白的可能性为 0.054。

## 2.6 跨膜区预测结果

据 TMHMM Server v.2.0 分析结果显示 (图 6), 品红色线表示各氨基酸处于膜外的概率, 结果表明 dybowskin-1ST 多肽链不含跨膜区域, 且

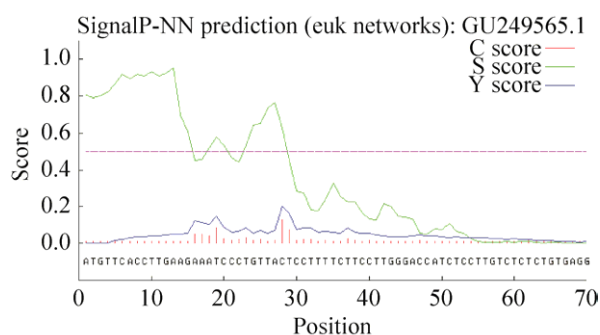


图 5 Dybowskin-1ST 信号肽预测

Fig. 5 Prediction of signal peptide of dybowskin-1ST.

该蛋白属于膜外蛋白。

## 2.7 dybowskin-1ST 磷酸化位点预测结果

NetPhos 3.1 Server 预测抗菌肽 dybowskin-1ST (图 7) 3 位、16 位苏氨酸残基处存在磷酸化修饰位点, 7 位、18 位、20 位丝氨酸残基处存在磷酸化修饰位点, 35 位、54 位酪氨酸残基处存在磷酸化修饰位点。

## 2.8 dybowskin-1ST 二级结构预测结果

采用 SOPMA 在线软件预测 dybowskin-1ST 的二级结构。如图 8A 所示, dybowskin-1ST 二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋 (Alpha helix)、延伸链 (Extended strand)、 $\beta$ -转角 (Beta turn) 和无规卷曲 (Random coil) 构成, 其中有 26 个氨基酸参与  $\alpha$ -螺旋 (蓝色) 的形成, 占 44.07%; 10 个氨基酸参与延伸链 (红色) 的形成, 占 16.95%; 2 个氨基酸参与  $\beta$ -转角 (绿色) 的形成, 占 3.39%; 21 个氨基酸参与

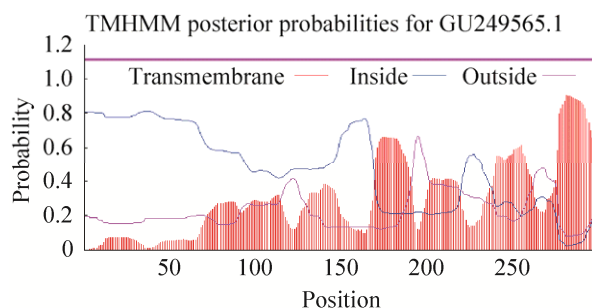


图 6 dybowskin-1ST 跨膜区预测

Fig. 6 Prediction of transmembrane region of dybowskin-1ST.

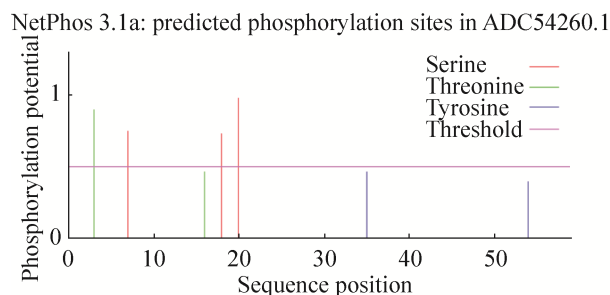


图 7 Dybowskin-1ST 磷酸化位点预测

Fig. 7 Predication of phosphorylation sites of dybowskin-1ST.



无规卷曲 (紫色) 的形成, 占 35.39%。二级结构预测表明该蛋白主要以  $\alpha$ -螺旋为主, 可推测该抗菌肽具有较强的抑菌活性。应用 Jpred4 进行二级结构分析的结果见图 8B, 此方式预测结果有限, 红色线条代表  $\alpha$ -螺旋区域, 分别在 Leu4-Ile17、Arg39-Glu44、Pro49-Ala56, 而其他类型二级结构

未能得出预测结果。为了进一步获得二级结构在多肽链中的具体区域, 利用 DNASTar Protean 软件的 Garnier-Robson 法和 Chou-Fasman 法进一步分析蛋白质二级结构, 如图 8C 所示, 结果见表 3。两种方法都显示 dybowskin-1ST 二级结构中  $\alpha$ -螺旋占比较高, 与上述结论基本相符。

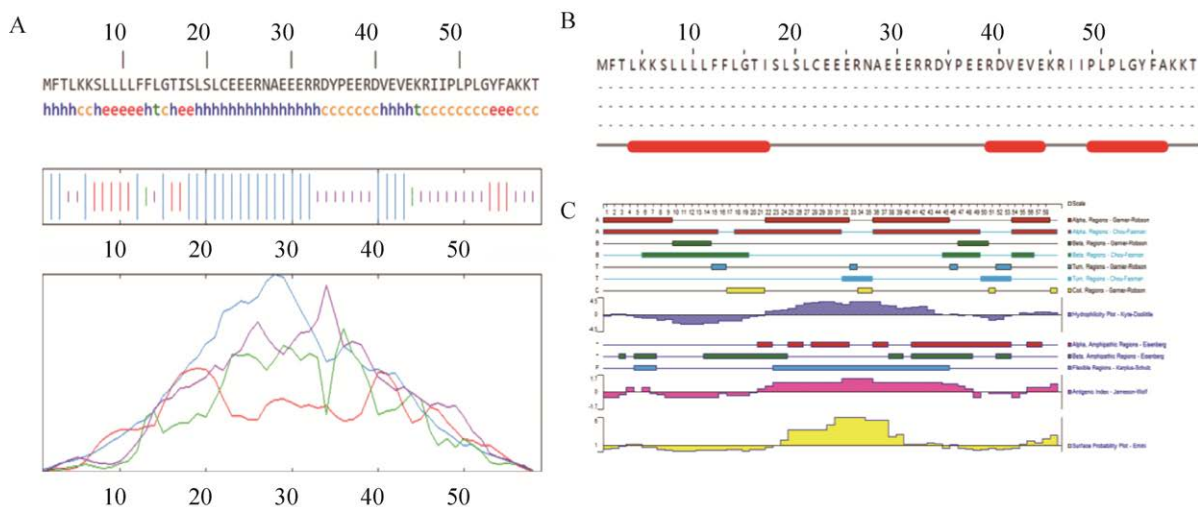


图 8 Dybowskin-1ST 二级结构预测 (A: SOPMA; B: Jpred4; C: DNASTar)

Fig. 8 Secondary structure prediction of dybowskin-1ST. (A) SOPMA. (B) Jpred4. (C) DNASTar.

表 3 Dybowskin-1ST 的二级结构预测

Table 3 Secondary structure of dybowskin-1ST predicted by DNASTar Protean

Methods	Alpha	Beta	Turn	Coil
Garnier-Robson	1-9	10-14	15-16	17-21
	22-32	47-50	33	34-35
	36-45		52-54	51
	54-58			59
Chou-Fasman	1-15	6-19	32-35	-
	18-31	45-49	50-53	
	36-49	54-56		
	54-59			

## 2.9 dybowskin-1ST 三级结构预测结果

利用 SWISS-MODEL 在线同源建模对 dybowskin-1ST 三级结构的预测结果 (图 9A), 由于缺乏同类型模板及同源结构, 此方式无法给出 dybowskin-1ST 的结构域组成及互作方式, 显示仅为 dybowskin-1ST 的 Leu10 到 Arg32 范围内的

三级结构示意图。使用穿线法在线预测软件 I-TASSER 进行三级结构预测结果 (图 9B), 两种结果都显示结构中  $\alpha$ -螺旋数量较多。

## 2.10 dybowskin-1ST B 细胞表位/T 细胞表位预测结果

使用 ABCpred 服务器预测 (阈值为 0.85)

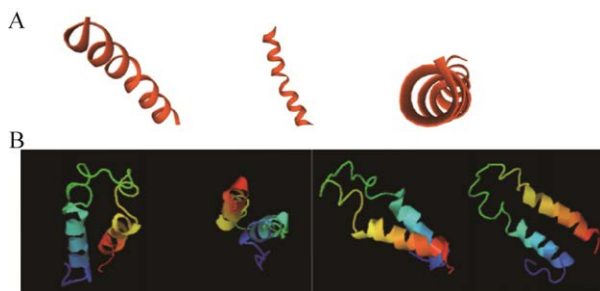


图 9 Dybowskin-1ST 三级结构预测 (A: SWISS-MODEL; B: I-TASSER)

Fig. 9 Tertiary structure prediction of dybowskin-1ST. (A) SWISS-MODEL. (B) I-TASSER.

dybowskin-1ST 含有 3 个 B 细胞抗原表位 (表 4)。利用 SYFPEITHI 在线软件,经 HLA-A\*02:01 (限制性 CTL 细胞表位) 分析 (阈值为 19) dybowskin-1ST 共有 6 个 T 细胞抗原表位 (表 5)。经 MHC 分型 RT1.AI 预测 (阈值为 19),发现有 2 个 T 细胞抗原表位 (表 5)。

2.11 dybowskin-1ST 的伤口愈合作用

小鼠皮肤伤口模型见图 10。经观察,涂抹

表 4 Dybowskin-1ST B 细胞表位预测  
Tab. 4 Prediction of B cell antigen epitopes of dybowskin-1ST (threshold:0.85)

Rank	Sequence	Start position	Score
1	EERRDYPEERDVEVEK	30	0.95
2	EEERRDYPEERDVEVE	29	0.89
3	LGTISLSLCEEERNAE	14	0.85

表 5 Dybowskin-1ST T 细胞表位预测  
Table 5 Prediction of T cell antigen epitopes of dybowskin-1ST (threshold:19)

Rank	Sequence	Start position	Score	Method
1	LLLFFLGTI	9-17	28	HLA-A*02:01
2	TLKKSLLLL	3-11	24	
3	FLGTISLSL	13-21	24	
4	LLLLFFLGT	8-16	21	
5	FTLKKSLLL	2-10	19	
6	LFFLGTISL	11-19	19	RT1.AI
1	KSLLLLFFL	6-14	20	
2	NAEEERRDY	27-25	20	



图 10 小鼠皮肤伤口模型  
Fig. 10 Wound model of mouse skin.

dybowskin-1ST 的小鼠伤口表面肉芽组织排列较为整齐,胶原分布均匀,大体无脓性分泌物,炎症反应较轻,表明抗菌肽一定程度地抑制了创面的细菌生长,同时愈合边缘较为整齐;而甘油对照组创面有白色脓性分泌物,肉芽组织干燥皱缩,新生胶原较少且排列紊乱 (图 11)。

2.12 dybowskin-1ST 的体外抑菌作用

通过纸片法测定 dybowskin-1ST (经紫外分光光度计法测定浓度为 100 mg/L) 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌的抑菌作用,结果表明 dybowskin-1ST 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌效果,但对白假丝酵母菌无明显抑菌效果,结果见图 12 和表 6。

采用 96 孔板法测定 dybowskin-1ST 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度 (MIC),结果见表 7。

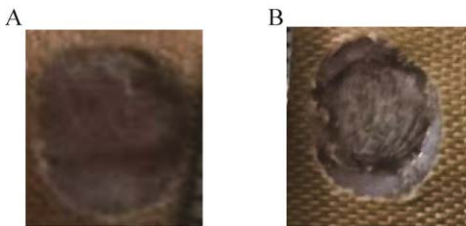


图 11 实验第 5 天的伤口对比图 (A: 80%甘油; B: dybowskin-1ST)  
Fig. 11 A comparison of the wounds on day 5. (A) 80% glycerol; (B) dybowskin-1ST).

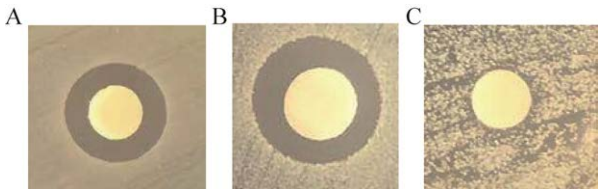


图 12 Dybowskin-1ST 的抑菌效果 A: 大肠杆菌; B: 金黄色葡萄球菌; C: 白假丝酵母菌  
Fig. 12 Antimicrobial effect of dybowskin-1ST. (A) Escherichia coli. (B) Staphylococcus aureus. (C) Candida albicans.

表 6 Dybowski-1ST 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌的抑菌圈大小

Table 6 Antimicrobial ring size of dybowski-1ST against three indicator strains

Bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Inhibitory zone diameter (cm)	1.19	1.23	0.60

表 7 Dybowski-1ST 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的 MIC 检测结果

Table 7 Determination of the MIC of dybowski-1ST against three indicator strains

Bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMCC(B)10104
MIC (mg/mL)	0.375	0.75	>1.5 mg/mL

### 3 讨论

多重耐药菌逐渐成为公共健康危机,包括院内感染耐药菌及抗生素滥用导致的家禽养殖常见菌等,导致多产业生物健康问题,人们迫切需要研发出区别于传统抗生素作用机制的新型抗菌剂<sup>[18-19]</sup>。抗菌肽属于机体固有免疫组分,在许多组织和细胞中表达,以响应 Toll 样受体 (TLR) 信号通路的激活<sup>[20]</sup>。有研究表明,抗菌肽可通过调节体内抗菌肽表达加强人体先天免疫<sup>[21]</sup>。抗菌肽被广泛认可的“成孔模型”抑菌机制,导致其不易产生耐药性。de Breij 等<sup>[19]</sup>的研究表明,抗菌肽 SAAP-148 能够通过对细菌膜产生渗透作用抑制部分多重耐药菌株生长和生物膜形成。然而,抗菌肽血清稳定性低,易被胰蛋白酶等水解,存在细胞毒性、生物利用度低及生产成本高等问题,限制了其进一步深入的临床应用。因此,目前研究人员以天然抗菌肽为基础,应用氨基酸替换、截断等方案进行蛋白质改造,克服天然抗菌肽的不足,提高应用性。同时, Bhonsle 等<sup>[22]</sup>认为将非天然氨基酸应用于抗菌肽改造方案中,能够提高其代谢稳定性和药代动力学等相关参数。总之,应用于抗菌肽的蛋白质改造已成为其发展为稳定抗菌剂的必然方向。

林蛙作为天然两栖类动物,皮肤等腺体可分泌大量多肽类物质。dybowski-1ST 是东北林蛙皮肤分泌物中筛选出的新型抗菌肽,能够促进小

鼠伤口愈合,可有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活性,但对于真菌及耐药菌的作用较弱。为改良亲本肽活性,设计出具有更高抑菌活性和稳定性的抗菌肽,本研究对 dybowski-1ST 进行生物信息学分析,结果显示其理论等电点为 5.10,电荷量为-2,亲水性平均系数为-0.358,负电荷氨基酸总数为 12,正电荷氨基酸总数为 10。蛋白内含有较多的亮氨酸、谷氨酸、精氨酸和赖氨酸,疏水性氨基酸含量较少,可能会导致其整合到脂质双层膜中介导细菌膜的渗透和破坏的能力较弱。dybowski-1ST 所带的负电荷和亲水肽的特性可能是限制其抑菌能力的主要原因。经预测,dybowski-1ST 可分别被共 18 种物质剪切,这可能是因为蛋白酶切割位点主要集中于赖氨酸和精氨酸。SignalP-5.0 及 TMHMM Server v.2.0 结果显示,dybowski-1ST 有信号肽,无跨膜区,提示 dybowski-1ST 可能为分泌蛋白,可通过构建载体进行表达和提取。经抗原表位预测,dybowski-1ST 具有 T 细胞表位和 B 细胞表位,可应用抗菌肽的抗原性进行定量检测。在对 dybowski-1ST 多肽链的二级结构及三级结构预测中, $\alpha$ -螺旋均占比较高,这与其抗菌活性的体现存在直接相关性。

dybowski-1ST 为 59 个氨基酸的抗菌肽,寻找到其抑菌活性表达区域是降低生产成本并有效保留活性的关键。对 dybowski-1ST 进行 N-端和 C-端截短并通过生物信息学方法进一步预测,结

果显示,将 C-端截短至保留 N-端 17 个氨基酸时,该多肽链的  $\alpha$ -螺旋占比、稳定性、电荷数较为符合高活性抗菌肽要求,因此笔者团队计划以保留 dybowskin-1ST N-端 17 个氨基酸的多肽链 (MFTLKKSLLLLFFLGTI) 为基础进行氨基酸修饰,以求获得较高抑菌活性的新型抗菌肽。同时为提高衍生肽疏水性,以疏水性氨基酸替换 15 位 Gly、16 位 Thr (亲水氨基酸),同时可形成完整的  $\alpha$ -螺旋肽链;使用 Arg、Lys 替换 3 位 Thr、15 位 Gly、16 位 Thr,使衍生肽电荷数在+4 至+6 之间,避免过高的电荷量导致细胞毒性增加<sup>[13]</sup>。抗菌肽的疏水性与其抑菌活性及细胞毒性均呈正相关,因此,需要在疏水性、细胞毒性和活性之间取得适当的平衡。为避免使衍生肽疏水性过强,应在一定范围内 (疏水力矩 0.08–0.12 及疏水性 0.8–1.2) 进行疏水性氨基酸替换。整体来讲,对抗菌肽进行氨基酸改造应注重结构及参数的平衡,避免破坏原有结构<sup>[16]</sup>。通过以上思路进行母肽的氨基酸截短和修饰,选择其中电荷数、疏水性及稳定性等性质较为适中且符合研究要求的进行后续实验,包括抑菌实验、细胞毒性实验、生物膜抑制实验等。由于抗菌肽不是通过单一受体或免疫系统的线性信号通路发挥作用的简单免疫调节剂,生物信息学方法能够通过构造蛋白质空间结构预测抑菌活性,但筛选出潜在抑菌活性较强的衍生肽后,仍需加以进一步实验验证,以此希望获得能够解决抗生素耐药性问题的新型抗菌肽。

## REFERENCES

- [1] Hancock RE, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(5): 321-334.
- [2] Cheng KT, Wu CL, Yip BS, et al. High level expression and purification of the clinically active antimicrobial peptide P-113 in *Escherichia coli*. *Molecules*, 2018, 23(4): 800.
- [3] Ouardien S, Drijfhout JW, Vaz FM, et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(11): 2404-2415.
- [4] Wang JJ, Dou XJ, Song J, et al. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 831-859.
- [5] Graf M, Mardirossian M, Nguyen F, et al. Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(7): 702-711.
- [6] Xu XQ, Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem Rev*, 2015, 115(4): 1760-1846.
- [7] 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 等. 中国东北地区林蛙属物种的分类学研究(两栖纲: 蛙科). *动物分类学报*, 1999, 24(2): 224-231.  
Xie F, Ye CY, Fei L, et al. Taxonomic study of the genus *Rana* in Northeast China (Amphibia: Ranidae). *Acta Zootaxonom Sin*, 1999, 24(2): 224-231 (in Chinese).
- [8] 郭娜. 东北林蛙皮肤抗菌肽 dybowskin-1ST 毕赤酵母表达体系的构建[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.  
Guo N. Expression and research of antibacterial peptide dybowskin-1ST from the skin of *Rana dybowskii*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011 (in Chinese).
- [9] 郭娜, 肖向红, 徐义刚, 等. 东北林蛙皮肤抗菌肽 dybowskin-1ST 的表达、纯化及抑菌活性分析. *中国农业科学*, 2011, 44(15): 3246-3251.  
Guo N, Xiao XH, Xu YG, et al. Expression, purification and antibacterial activity analysis of *Rana dybowskii* antimicrobial peptide dybowskin-1ST. *Sci Agric Sin*, 2011, 44(15): 3246-3251 (in Chinese).
- [10] 周旋, 肖向红, 李玉. 东北林蛙皮肤抗菌肽 dybowskin-1ST 的抗病毒活性分析. *野生动物*, 2013, 34(3): 171-173.  
Zhou X, Xiao XH, Li Y. Antiviral activity analysis of *Rana dybowskii* antimicrobial peptide dybowskin-1ST. *Chin J Wildl*, 2013, 34(3): 171-173 (in Chinese).
- [11] 苗慧敏, 肖向红, 孙婷婷, 等. 东北林蛙皮肤抗菌肽 dybowskin-1ST 对小鼠皮肤创伤愈合的作用. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 125-128.  
Miao HM, Xiao XH, Sun TT, et al. Study on effect of

- antimicrobial peptides dybowskin-1 ST from skin of *Rana dybowskii* on wound healing skin of mice. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2011, 17(23): 125-128 (in Chinese).
- [12] 李玉, 刘琦, 王敬之, 等. 东北林蛙重组抗菌肽 dybowskin-1ST 部分理化特性和生物学活性研究. 野生动物学报, 2016, 37(2): 129-133.  
Li Y, Liu Q, Wang JZ, et al. The physicochemical properties and biological activity of recombinant antimicrobial peptide-dybowskin-1ST in *Rana dybowskii*. Chin J Wildlife, 2016, 37(2): 129-133 (in Chinese).
- [13] Wang JJ, Song J, Yang ZY, et al. Antimicrobial peptides with high proteolytic resistance for combating gram-negative Bacteria. J Med Chem, 2019, 62(5): 2286-2304.
- [14] Guida F, Benincasa M, Zahariev S, et al. Effect of size and N-terminal residue characteristics on bacterial cell penetration and antibacterial activity of the proline-rich peptide Bac7. J Med Chem, 2015, 58(3): 1195-1204.
- [15] Lv YF, Wang JJ, Gao H, et al. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential  $\alpha$ -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86364.
- [16] Wang JJ, Dou XJ, Song J, et al. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era. Med Res Rev, 2019, 39(3): 831-859.
- [17] Hao G, Le GW, Shi YH, et al. Molecular design, structural analysis and bactericidal activity of derivatives of antimicrobial peptide buforin II. Acta Pharmaceut Sin, 2013, 48(3): 366-371.
- [18] Neogi SB, Islam MM, Islam SKS, et al. Risk of multi-drug resistant *Campylobacter* spp. and residual antimicrobials at poultry farms and live bird markets in Bangladesh. BMC Infect Dis, 2020, 20: 278.
- [19] de Breij A, Riool M, Cordfunke RA, et al. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. Sci Transl Med, 2018, 10(423): eaan4044.
- [20] Dou XJ, Han JL, Song WT, et al. Sodium butyrate improves porcine host defense peptide expression and relieves the inflammatory response upon Toll-like receptor 2 activation and histone deacetylase inhibition in porcine kidney cells. Oncotarget, 2017, 8(16): 26532-26551.
- [21] Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resist Updat, 2016, 26: 43-57.
- [22] Bhonsle JB, Clark T, Bartolotti L, et al. A brief overview of antimicrobial peptides containing unnatural amino acids and ligand-based approaches for peptide ligands. Curr Top Med Chem, 2013, 13(24): 3205-3224.

(本文责编 郝丽芳)