

利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 α -螺旋抗菌肽

王良 马清泉 单安山* 董娜 吕银凤

(东北农业大学 动物营养研究所 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】根据螺旋轮模型设计以亮氨酸(L)为疏水面, 赖氨酸(K)为亲水面的新型 α -螺旋抗菌肽 LK, 并对该抗菌肽的生物学活性进行检测。【方法】利用圆二色光谱分析 LK 的二级结构, 同时, 评价 LK 的抑菌活性、稳定性和细胞选择性。【结果】在模拟细胞膜的环境中 LK 呈 α -螺旋型结构。LK 对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有很强的抑菌活性, 最小抑菌浓度(MIC)在 2–4 $\mu\text{mol/L}$ 之间。LK 具有很强的酸碱盐稳定性。肽浓度为 2–4 $\mu\text{mol/L}$ 时, LK 表现出较低的溶血活性和细胞毒性。【结论】根据螺旋轮模型结构, 以疏水性的 L 和正电荷性的 K 设计的新型抗菌肽 LK 具有较高的细胞选择性及稳定性, 具有替代抗生素的发展潜力。

关键词: 抗菌肽, α -螺旋, 溶血活性, 细胞毒性

Rational design of α -helical antimicrobial peptide with Leu and Lys residues

WANG Liang MA Qing-Quan SHAN An-Shan* DONG Na LÜ Yin-Feng

(Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] We designed a new antibacterial peptide LK. The peptide was composed of Leu residues in the nonpolar face and Lys residues in the polar face based on the helical wheel projection. The activities of LK were tested. [Methods] The secondary structure of LK was studied by Circular Dichroism (CD) spectrometry. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of LK against Gram-positive and Gram-negative bacteria were determined. The stability, hemolytic activity and cytotoxicity of LK were also determined. [Results] LK had strong antimicrobial activities against detected bacteria with MICs of 2–4 $\mu\text{mol/L}$. LK exhibited high pH stability and salt tolerance. The peptide showed very weak hemolysis against human red blood cells and cytotoxicity against vero cells at its MICs. [Conclusion] These results suggest that LK might have potential as an attractive potential alternative to pharmaceutical antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptide, α -Helical, Hemolysis, Cytotoxicity

抗生素在畜牧业中的应用非常广泛,能够提高饲料转化率、防治疾病的发生,从而节约生产成本。但是近年来,抗生素的滥用却导致了大量耐药性菌

株的出现^[1-2],而且抗生素的残留会对人类健康和环境安全产生直接的影响^[3-4]。因此,寻找安全无毒的抗生素替代品是非常迫切的需求。大量研究发

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31072046, 31272453); 黑龙江省教育厅重点项目(No. 11551z003)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190685; 信箱: asshan@neau.edu.cn

收稿日期: 2013-03-08; 接受日期: 2013-04-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

现抗菌肽具有替代抗生素的潜质^[5-6]。抗菌肽是机体先天性免疫系统中的重要组成部分,具有广谱的抗菌活性。抗菌肽富含阳离子氨基酸,可通过静电吸引直接作用于细菌细胞膜,不易产生耐药性,而且抗菌肽属于多肽类,不易产生药物残留的问题^[7]。抗菌肽在自然界分布非常广泛,目前,APD (Antimicrobial peptide database) 数据库 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) 已经收录了 2 100 多种天然抗菌肽。但是许多天然抗菌肽存在抗菌活性不强、溶血、细胞毒性等缺点。因此,提高抗菌肽抗菌活性的同时降低其对机体本身的毒性是抗菌肽研究中的热点。

两亲性 α -螺旋型抗菌肽具有很强的抗菌活性,抗菌谱较广,而且肽链长度较短,相对于其它抗菌肽结构简单,易于通过圆二色谱等技术进行结构测定,是目前研究的较多的一类抗菌肽^[8-9]。本研究在 α -螺旋模型的基础上^[10],参照 Ma 等利用精氨酸(R)和缬氨酸(V)设计的新型 α -螺旋抗菌肽 VGR16^[11],以 L 为疏水面, K 为亲水面构建新型抗菌肽 LK (图 1),然后利用圆二色光谱分析 LK 的二级结构,并检测其抗菌活性、稳定性、溶血活性和细胞毒性,为抗菌肽的开发利用提供基础数据。

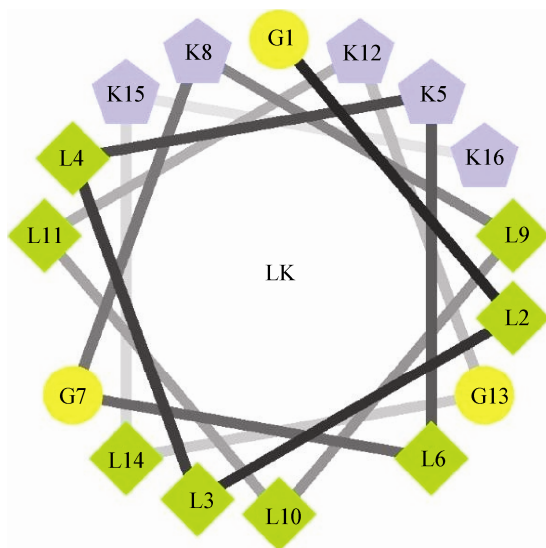


图 1 LK 的螺旋轮结构

Figure 1 Helix wheel projection of LK

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和试剂: 大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC O78)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum* C79-13)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)由东北农业大学动物营养研究所提供。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* C77-31)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CMCC 63501)为东北农业大学动物医学学院传染病研究室惠赠。DMEM 培养基及小牛血清均为 Gibco 公司生产;Triton X-100 和三氟乙醇(TFE)购自 Sigma 公司。

1.1.2 肽合成: 设计得到的抗菌肽由固相化学合成法合成,反相高效液相色谱纯化(纯度>95%),电喷射质谱鉴定。此过程由吉尔生化公司(上海)进行。

1.2 圆二色谱分析

将抗菌肽溶于 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)和 50% 三氟乙醇(TFE),至肽浓度为 100 μ mol/L。圆二色光谱仪石英样品池的光程为 0.1 cm,扫描测定波长范围为 190–250 nm,分辨率 0.5 nm,带宽 1.0 nm,扫描速度为 50 nm/min,在室温下进行测定。圆二色谱用平均残基摩尔椭圆度表示,单位为:度·厘米²/分摩尔(deg·cm²/dmol)。

1.3 抑菌活性检测

参考 Steinberg 等改进的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentrations, MIC)测定方法^[12],测定 LK 对 *E. coli* ATCC 25922、*P. aeruginosa* ATCC 27853、*S. typhimurium* C77-31、*S. Pullorum* C79-13、*E. coli* O78、*S. aureus* ATCC 25923、*S. epidermidis* ATCC12228、*B. subtilis* 63501 和 *S. aureus* ATCC 29213 的抑菌活性。将细菌培养至对数生长期,用 MH 肉汤培养稀释至

10^5 CFU/mL。在 96 孔板中用 0.2% BSA 和 0.01% 乙酸倍比稀释抗菌肽,将培养好的细菌与稀释好的抗菌肽混合均匀后,于 37 °C 孵育 20–24 h。阳性对照中不添加抗菌肽,阴性对照中既不添加抗菌肽也不接种细菌。用酶标仪测定 492 nm 处的吸光度,与阴性对照对比确定 MIC 值。此外,本实验室还测定了链霉素和氯霉素对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的 MIC 值,用来与 LK 的抗菌活性进行对比。

1.4 稳定性检测

LK 稳定性的测定试验所用到的细菌均为 *E. coli* ATCC 25922,对照组均为未经处理的 LK。抑菌活性的测定方法为上述的 MIC 法。

1.4.1 酸碱稳定性:用乙酸-氨水缓冲体系调节 pH 值分别为 2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 的溶液孵育处理 LK 1 h,测定 LK 的 MIC 值,以此判断抗菌肽在经过不同酸碱度的溶液处理后的抑菌活性。

1.4.2 盐稳定性:将 LK 用终浓度分别为 50、150 和 300 mmol/L NaCl 溶液处理 1 h,然后将处理后的抗菌肽与待测菌液混合均匀,37 °C 培养,测定 LK 的 MIC 值。

1.4.3 胰蛋白酶稳定性:在 37 °C 水浴条件下,用终浓度为 1 g/L 的胰蛋白酶处理抗菌肽 1 h,测定经过酶处理之后 LK 的 MIC 值。

1.4.4 血清稳定性:用小牛血清倍比稀释 LK,使小牛血清的终浓度 10%,测定 LK 在 10%小牛血清的 MIC 值。

1.5 溶血活性测定

采集新鲜人血,1 000×g 离心 5 min,弃除上清液,收集红细胞。用磷酸缓冲溶液(PBS)洗涤 3 遍,并重悬细胞,使细胞浓度为 1% (体积百分数)。倍比稀释抗菌肽,与红细胞悬液等体积混合,在 37 °C 培养箱内恒温孵育 1 h。以 PBS 作为阴性对照,0.1% Tritonx-100 作为阳性对照。将培养液于 1 000×g 离心 5 min,吸取上清液并依次加入 96 孔板中,用酶标仪在 492 nm 处测其吸光值,每组取平均值。

1.6 细胞毒性测定

将复苏后的 Vero 细胞在含有 10%小牛血清的 DMEM 中进行培养,培养条件为:37 °C、5% CO₂、饱和湿度。采用胰蛋白酶消化法进行细胞传代,适度消化后充分吹打细胞使其形成单细胞悬液。将悬液加入 96 孔板中,每孔 100 μL,浓度约为 2×10^4 cells/孔。待细胞贴壁后,分别加入含不同浓度抗菌肽的培养液,培养 20–24 h。阳性对照中不添加抗菌肽,阴性对照抗菌肽和细胞均不添加。每孔中加入 10 μL CCK8 试剂盒中的试剂,用微孔振荡仪进行振荡混匀,再在细胞培养箱内继续孵育 1 h。然后将 96 孔板取出,使用酶联免疫检测仪在 450 nm 测其吸光值。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽的设计

如图 1 所示,8 个 L 和 5 个 K 分别构成 LK 的疏水面和亲水面,以保证抗菌肽的两亲性。在第 1、7 和 13 位添加了甘氨酸(G)以维持抗菌肽的进化保守性。并且为了增强稳定性,LK 的 C-末端被酰胺化^[13]。LK 的氨基酸序列为:GLLLKLGKLLLKGLKK-NH₂,具体结构参数见表 1。

肽 Peptide	分子量 MW (Da)	平均疏水性 H	电荷 Net charge
LK	1 734.35	0.53	+6

注:MW:分子量;H:通过 Fauchere 和 Pliska 的方法预测的平均疏水性^[14]。

Note: MW: Molecular weight; H: The hydrophobicity per residue of peptides calculated by the method of Fauchere and Pliska^[14].

2.2 圆二色谱

在磷酸盐缓冲液中,LK 在 200 nm 波长附近都呈现出负的特征性尖峰,说明抗菌肽呈现出自由卷曲的结构特征;在模拟细胞膜的三氟乙醇中,LK 在 192 nm 附近有一正的谱带,在 222 nm 和 208 nm 处表现出 2 个负的特征肩峰谱带,说明 LK 在三氟乙醇缓冲液中呈现出明显的 α-螺旋结构(图 2)。

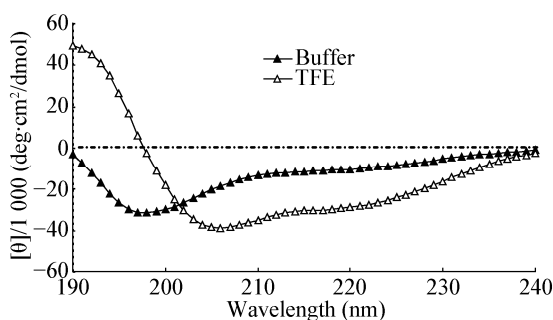


图2 LK的圆二色光谱分析

Figure 2 CD spectrum of LK

2.3 抑菌活性

LK、链霉素和氯霉素的MIC值见表2。LK对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有较强的抑菌活性,对测定的5种革兰氏阴性菌的MIC值均在2–4 $\mu\text{mol/L}$ 之间,对4种革兰氏阳性菌的MIC值均为2 $\mu\text{mol/L}$ 。就本试验中的测试菌而言,LK的抗菌活性比氯霉素强得多,与链霉素较为接近,而

且对 *S. Pullorum* C79-13 和 *S. aureus* ATCC 29213 的MIC值相同。

2.4 稳定性

与对照相比,经过不同酸碱度、盐和胰蛋白酶的处理之后,LK的抗菌活性没有发生改变,对 *E. coli* ATCC 25922 的MIC仍为2 $\mu\text{mol/L}$ 。在含10%小牛血清的条件下,LK对 *E. coli* ATCC 25922 的MIC为4 $\mu\text{mol/L}$ (表3)。

2.5 溶血活性

如图3所示,在2–4 $\mu\text{mol/L}$ 时,LK对人血细胞的溶血率约为3%;在64 $\mu\text{mol/L}$ 时的溶血率约为50%。

2.6 细胞毒性

由图4可知,在2–8 $\mu\text{mol/L}$ 时,LK对Vero细胞基本没有毒性,细胞存活率在95%以上。当浓度超过8 $\mu\text{mol/L}$ 时,LK对Vero细胞的毒性逐渐增强,细胞存活率随之下降。

表2 LK和抗生素的抑菌活性
Table 2 Antimicrobial activity of LK and antibiotics

细菌 Bacteria	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{mol/L}$)		
	LK	链霉素 Streptomycin	氯霉素 Chloroamphenicol
革兰氏阴性菌 Gram negative bacteria			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	<0.5	8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4	2.0	>256
<i>S. typhimurium</i> C77-31	2	2.0	16
<i>S. Pullorum</i> C79-13	4	4.0	16
<i>E. coli</i> O78	4	–	–
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	–	–
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	2	1.0	32
<i>B. subtilis</i> CMCC 63501	2	<0.5	32
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2	2.0	>256

表3 LK 的稳定性 Table 3 The stability of LK	
方法 Methods	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{mol/L}$)
酸	2
pH 2.0	
碱	2
pH 10.0	
氯化钠	2
NaCl (300 mmol/L)	
胰蛋白酶	2
Trypsin (1 g/L)	
小牛血清	4
Calf serum (10%, V/V)	

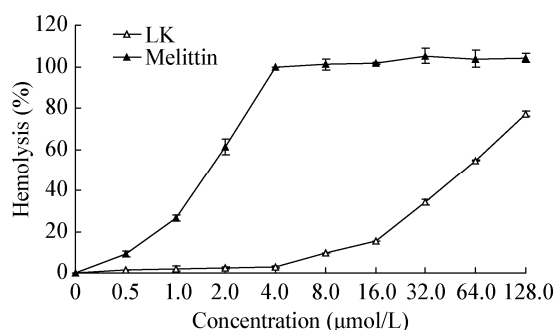


图3 LK 的溶血活性

Figure 3 Hemolytic activity of LK

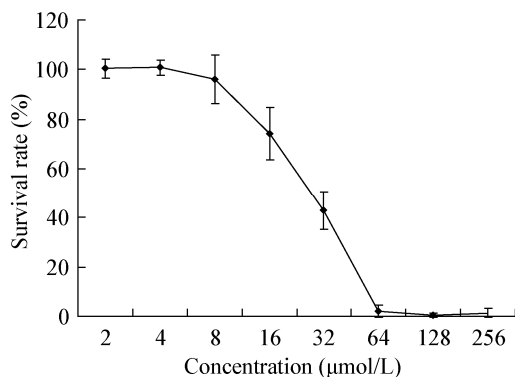


图4 LK 的细胞毒性

Figure 4 Cytotoxicity activity of LK

3 讨论

16 个氨基酸的长度可以在细胞膜表面形成孔道或跨过脂质双分子层^[15]。天然 α -螺旋型抗菌肽中,含 4-6 个正电荷且疏水性氨基酸残基含量在 50%-60%的肽比较多^[16]。因此本试验利用螺旋轮

法设计新型抗菌肽 LK 的长度为 16 个氨基酸,5 个正电荷性氨基酸(K)和 8 个疏水性氨基酸(L)交替连接,以 G 作为 LK 另外 20%的氨基酸组成。之所以选择 G 连接 K 和 L,是因为 G 能够在一定程度上降低抗菌肽的溶血活性和细胞毒性。肽 C-末端酰胺化后不仅可以增强肽的稳定性,还能为肽增加一个正电荷,使 LK 的净电荷变为+6。将 LK 进行 CD 光谱分析,结果显示 LK 在磷酸盐缓冲液中为自由卷曲的结构,而在模拟膜环境中呈规则的 α -螺旋结构,这表明 LK 像大多数抗菌肽一样,在细菌表面的疏水环境中发生了构象改变^[17-18]。

一般来讲,两亲性 α -螺旋抗菌肽具有阳离子性,可以与负电荷性的细菌细胞膜结合,然后疏水性氨基酸与脂质双分子层相互作用,破坏细胞膜的完整性,从而发挥抗菌作用^[19-20]。本试验中,LK 具有很强的抗革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的活性,抗菌活性接近于链霉素,这可能与肽的两亲性有关:K 是带有正电荷的氨基酸,使得肽带有净正电荷,它可与细菌表面带有负电荷的脂多糖发生静电吸引作用,使抗菌肽吸附在细菌表面;L 是疏水性残基,使得肽具有很强的疏水性,它可渗入脂质双分子层破坏细胞膜的结构,改变细胞的渗透性,进而发挥杀菌作用^[21]。Wiradharma 等设计的 α -螺旋抗菌肽(LLKK)₃ 抗菌活性相对较弱,对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的 MIC 值分别为 31.3 mg/L 和 125 mg/L。(LLKK)₃ 与 LK 都是以 L 和 K 分别作为疏水型氨基酸和阳离子性氨基酸,L 的含量均为 50%,但是(LLKK)₃ 中无 G,肽链长度较短。或许正是由于(LLKK)₃ 相对于 LK 肽链太短,不易通过形成孔道或跨过细胞膜发挥抗菌作用,因此抗菌活性相对较弱^[22-23]。马清泉等设计的抗菌肽 LGR16 与本研究中的 LK 是在同一个螺旋轮模型上设计出的 α -螺旋抗菌肽,不同之处就是 LK 的亲水性氨基酸为 K,而 LGR 的亲水性氨基酸为 R。这两条肽都具有很强的杀 *E. coli* 和 *S. aureus* 活性, MIC 值都在 2-4 $\mu\text{mol/L}$ 之间^[24]。LGR16 和 LK 的抗菌活性明显高于(LLKK)₃,这是由于按照本研究中

所用的模型设计出的 α -螺旋抗菌肽具有较强的疏水性和较高的正电荷性,这就保证了设计出的肽按照 α -螺旋抗菌肽的膜作用机制发挥较强的杀菌活性^[25]。

稳定性是抗菌肽应用于实践的重要条件,因此,有必要检测抗菌肽在不同条件下的稳定性。研究表明,许多抗菌肽具有某种或多种稳定性^[26]。本研究中,对 LK 耐受酸、碱、盐和抗蛋白酶水解的能力进行了评价。分别经过 pH 2.0、10.0 及 300 mmol/L NaCl 处理 1 h 后,LK 的抑菌活性没有受到影响,这表明 LK 有很强的耐酸碱盐能力。胰蛋白酶能够专一性的水解 K 或 R 的羧基端肽键,LK 中含有 5 个 K,但是经过终浓度为 1 g/L 的胰蛋白酶处理 1 h 之后,LK 对测定菌株 *E. coli* ATCC 25922 的 MIC 值并没有发生变化,这可能是由于高疏水性使 LK 无法与胰蛋白酶的活性中心结合,或者只有部分 K 羧基端肽键被水解,但并没有对 LK 的两亲性结构产生重大的影响,总之,LK 具有较强的耐胰蛋白酶水解能力。在含 10%小牛血清的环境中,LK 的 MIC 值为 4 $\mu\text{mol/L}$,说明 LK 在该环境仍能保持较强的抗菌活性。由上可见,LK 的稳定性非常强,这对于肽在实际中的应用非常有利。

细胞选择性(Cell selectivity)是指抗菌肽对不同细胞的生物学活性不同。抗菌肽疏水性和电荷性对抗菌肽的细胞选择性影响很大^[27]。本试验中,LK 在 64 $\mu\text{mol/L}$ 时引起 50%的人血细胞发生溶血,而马清泉等设计的 VGR16 在 256 $\mu\text{mol/L}$ 时仍然没有溶血活性^[11],这表明 V 在降低抗菌肽溶血活性方面具有重要的应用价值。本试验中选择典型的 α -螺旋抗菌肽蜂毒素(Melittin)与 LK 进行溶血活性对比,由图 3 可知,Melittin 的溶血活性非常强,在 4 $\mu\text{mol/L}$ 时几乎可以破坏全部红细胞,而 LK 在此浓度下的溶血率仅为 2.8%。在含 10%小牛血清环境中,肽浓度为 2-4 $\mu\text{mol/L}$ 时,LK 对 Vero 细胞无毒性;当浓度增加到 8 $\mu\text{mol/L}$ 时,LK 开始显示出对 Vero 的细胞毒性。而 LK 在含 10%小牛血清

的环境中对 *E. coli* 的 MIC 值为 4 $\mu\text{mol/L}$,也就是说在相同条件下,LK 开始发挥杀菌作用的时候对 Vero 没有毒性,这表明 LK 具有较高的细胞选择性。这可能是由于细菌的细胞膜外叶主要是由带负电荷的磷脂组成的,而真核细胞的细胞膜外叶主要是由中性的磷脂组成^[15],两亲性的 α -螺旋抗菌肽为阳离子性,容易与带负电荷的细菌细胞膜相互作用。而且 LK 中含有 3 个 G,有研究表明 G 能够在一定程度上降低抗菌肽的溶血活性和细胞毒性,而对抑菌活性影响较小^[28-29]。

综上所述,根据螺旋轮模型设计出的两亲性 α -螺旋型抗菌肽 LK 具有很强的抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌活性,稳定性较强,而且溶血活性和细胞毒性相对较弱,在最小抑菌浓度时几乎未表现出溶血活性和细胞毒性。因此 LK 具有成为抗生素替代物的潜力。

参 考 文 献

- [1] Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39(6): 529-533.
- [2] Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(8): 419-426.
- [3] Armağan Ö. Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices[J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 197-203.
- [4] Novo A, André S, Viana P, et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater[J]. Water Research, 2013, 47(5): 1875-1887.
- [5] Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease[J]. Clinical Immunology, 2010, 135(1): 1-11.
- [6] Wu S, Zhang FR, Huang ZM, et al. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*[J]. Peptides, 2012, 35(2): 225-230.
- [7] 单安山, 马得莹, 冯兴军, 等. 抗菌肽的功能、研发与应用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2249-2259.
- [8] Wiradharma N, Khoe U, Hauser CA, et al. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents[J]. Biomaterials, 2011, 32(8): 2204-2212.
- [9] Mura M, Dennison SR, Zvelindovsky AV, et al. Aurein

- 2.3 functionality is supported by oblique orientated α -helical formation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828(2): 586-594.
- [10] Schiffer M, Edmundson AB. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential[J]. *Biophysical Journal*, 1967, 7(2): 121-135.
- [11] 马清泉, 董娜, 曹艳萍, 等. 利用精氨酸和缬氨酸设计新型 α -螺旋抗菌肽[J]. *微生物学报*, 2011, 51(3): 346-351.
- [12] Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(8): 1738-1742.
- [13] Liu LP, Deber CM. Uncoupling hydrophobicity and helicity in transmembrane segments. Alpha-helical propensities of the amino acids in non-polar environments[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(37): 23645-23648.
- [14] Fauchere JL, Pliska VE. Hydrophobic parameters-pi of amino-acid side-chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1983, (18): 369-375.
- [15] Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides[J]. *Biopolymers*, 2002, 66(4): 236-248.
- [16] Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure—activity relationship studies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758(9): 1436-1449.
- [17] Wang Y, Hong J, Liu X, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics[J]. *PLoS One*, 2008, 16(3): e3217.
- [18] Chen W, Yang BW, Zhou HM, et al. Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15[J]. *Peptides*, 2011, 32(12): 2497-2503.
- [19] Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model[J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5(10): 905-917.
- [20] Engler AC, Wiradharma N, Ong ZY, et al. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections[J]. *Nano Today*, 2012, 7(3): 201-222.
- [21] Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes[J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(2): 149-177.
- [22] Wiradharma N, Khoe U, Hauser CA, et al. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8): 2204-2212.
- [23] Wiradharma N, Khan M, Yong LK, et al. The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(34): 9100-9108.
- [24] 马清泉, 单安山, 董娜, 等. 富含亮氨酸和精氨酸的抗菌肽设计[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(6): 804-807.
- [25] Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758(9): 1245-1256.
- [26] Güell I, Micaló L, Cano L, et al. Peptidotriazoles with antimicrobial activity against bacterial and fungal plant pathogens[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 9-17.
- [27] Ma QQ, Shan AS, Dong N, et al. The effects of Leu or Val residues on cell selectivity of α -helical peptides[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2011, 18(11): 1112-1118.
- [28] Ilić N, Novković M, Guida F, et al. Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828(3): 1004-1012.
- [29] Juretić D, Vukićević D, Ilić N, et al. Computational design of highly selective antimicrobial peptides[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2009, 49(12): 2873-2882.