

Peptaibols 类抗菌肽—Trichokonin VI 在不同溶剂中 构象变化的圆二色谱研究

董小卫^{1,4}, 宋晓妍^{2,3*}, 石梅², 张玉忠²

1. 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250114
2. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100
3. 济南大学医学与生命科学学院, 山东 济南 250022
4. 山东中烟工业公司技术中心, 山东 济南 250013

摘要 Trichoder VI 是拟康氏木霉 SMF2 (*Trichoderma pseudokoningii* SMF2) 产生的一种含有 20 个氨基酸的 peptaibol 类抗菌肽。采用圆二色谱法研究了不同极性溶剂体系和膜拟态环境对 Trichokonin VI 的二级结构的影响, Trichokonin VI 在不同有机溶剂体系中具有典型的螺旋结构特征, 而在水溶液体系中螺旋明显减少, 不超过 30% 的三氟乙醇可以随浓度增加而诱导螺旋结构的增加。Trichokonin VI 在磷酸缓冲液中峰的强度随浓度增加而增强, 具有浓度依赖性。SDS 浓度的增加可以诱导螺旋含量的增加。与非拟态环境相比, 膜拟态环境可以明显增加 Trichokonin VI 的螺旋含量, 表明 Trichokonin VI 可以和脂膜相互作用。

关键词 Trichokonin VI; peptaibols; 圆二色谱; 构象

中图分类号: Q586 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0458-04

引言

Peptaibols 是一类由非核糖体合成酶 (non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs) 合成的富含 α -氨基异丁酸 (Aib)、具 α -螺旋结构, 对细菌、真菌等有拮抗作用的一类特殊的肽类抗生素的总称^[1]。Peptaibols 主要来源于木霉属及其相近的属并表现出了多样的生物学活性, 可以促进儿茶酚的分泌、使线粒体氧化磷酸化的解偶联、溶血活性、免疫抑制活性等。通过对 peptaibols 序列组成分析发现在所有已知序列中含有 40% 的 Aib 残基^[2]。Aib 残基的存在有利于形成 α -螺旋结构, 所有现在已知的 peptaibols 都是高度螺旋化的, 脯氨酸(Pro)和羟脯氨酸(Hyp)则促使螺旋的弯曲(bends)或拐点(kinks)的形成。谷氨酸(Glu)是唯一的强极性氨基酸残基, 其位置和数量与其作为离子通道的功能特征有关。芳香族氨基酸主要集中在末端, 有利于 peptaibols 在双层膜中的稳定^[3]。一般认为 peptaibols 的作用机制与其对膜的作用相关。

Trichokonin VI 是拟康氏木霉 SMF2 (*Trichoderma*

pseudokoningii SMF2) 产生的一种 peptaibols 类抗菌肽, 其具有广谱的抗菌活性, 可以有效地抑制革兰氏阳性细菌和多种真菌的生长^[4,5]。圆二色(CD)谱法是研究蛋白质和肽在溶液中二级结构的有力工具, 尤其适用于分析在不同环境中的构象变化。由于 Trichokonin VI 的结构中含有 8 个非手性的 α -氨基异丁酸(Aib), 因此基于常规氨基酸分析建立起来的各种分析方法并不适用于 peptaibols 的结构分析, 本文采用 222 nm 单一峰值比较研究了不同溶剂条件对 Trichokonin VI 的二级螺旋结构的影响, 为其结构与功能的研究提供了科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂

Trichokonin VI 采用所建立的高效液相色谱法纯化得到^[6], 其结构为: Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phe-OH。将其用三氟乙醇(2,2,2-Trifluoroethanol TFE)配成 2 mmol · L⁻¹ 母液备用。NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, SDS 和 TFE 购自 sigma 公

收稿日期: 2009-09-09, 修订日期: 2009-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870047), 国家(863 计划)项目(2007AA091504), 教育部博士点基金项目(20060422053)和山东省自然科学基金项目(Z2008B09)资助

作者简介: 董小卫, 1972 年生, 山东中烟工业公司技术中心高级农艺师 e-mail: youxiang212@tom.com

* 通讯联系人 e-mail: chm_songxy@ujn.edu.cn

司,其他溶剂均为国产色谱纯试剂(天津四友公司)。去离子水(电阻 $\geq 18\text{ M}\Omega$)。

1.2 主要仪器

J-810 园二色光谱仪(Jasco, 日本),可控温循环水浴装置(Julabo, 德国)。

1.3 圆二色性的测定

CD 光谱的测定在 Jasco J-810 CD spectropolarimeter 分光偏振仪上进行,光谱仪上装备有 Peltier 型温控系统。数据摩尔椭圆率 $[\theta]$ 单位 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$,通过公式 $[\theta] = 100\theta/(c \times l)$ 计算, c 表示肽的摩尔浓度, l 表示比色杯的厚度(cm)。检测波长 far-UV CD 从 190~260 nm,检测步长为 2 nm,狭缝宽度为 4 nm,扫描速度为 $200\text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,石英杯径 2 mm,每个样品都是扫描 3 次的平均值,除去 Trichokonin VI 以外的相同溶液作为背景扣除。除去温度试验,检测均在室温($20\text{ }^\circ\text{C}$ 左右)进行。

1.4 溶剂条件对 Trichokonin VI 结构的影响

采用水、甲醇(MeOH)、乙醇(EtOH)、三氟乙醇(TFE)、乙腈(MeCN),PBS 缓冲液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)作为溶剂,测定 Trichokonin VI 在不同溶剂体系中的 CD 谱特征,Trichokonin VI 的终浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.5 TFE 浓度对 Trichokonin VI 结构的影响

采用含不同浓度 TFE(5%, 10%, 20%, 30%, 50% 和 100%)的 PBS 缓冲液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)配制 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Trichokonin VI 溶液进行 CD 谱测定。

1.6 Trichokonin VI 浓度对其结构的影响

采用 PBS 缓冲液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)配制不同浓度的 Trichokonin VI 溶液(5, 10, 20, 50, $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后进行 CD 谱测定。

1.7 膜拟态环境对 Trichokonin VI 结构的影响

采用 PBS 缓冲液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)配制含有不同浓度的 SDS(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 和 $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的溶剂体系,Trichokonin VI 的浓度为 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,CD 谱测定膜拟态环境条件下 Trichokonin VI 的构象变化。

2 结果与分析

2.1 Trichokonin VI 在水和不同溶剂中的 CD 谱特征

将 Trichokonin VI 溶解于不同的有机溶剂,磷酸盐缓冲液(PBS, $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)和水中,测定不同溶剂条件对 Trichokonin VI 二级结构的影响。Trichokonin VI 在 H_2O , PBS, EtOH, MeOH, MeCN 和 TFE 的从 190~250 nm 的远紫外 CD 谱见图 1。从图 1 中可以看出在除了 TFE 的有机溶剂中,Trichokonin VI 的 CD 谱在 194 nm 附近有一个正峰,在 208 和 222 nm 左右有 2 个负峰。这是螺旋的典型特征峰。这些峰分别代表 $\pi-\pi^*$ 平行跃迁, $\pi-\pi^*$ 垂直跃迁和 $n-\pi^*$ 跃迁。在 TFE 中 CD 谱的峰形与其他有机溶剂相似,但是其 208 nm 左右的峰蓝移,其强度也明显降低。这说明在 TFE 中 3_1-helix , $\beta\text{-turn}$ 和无规则卷曲的含量增加。在水和 PBS 中,其 CD 谱特征相似,但其 208 nm 的峰强度较

弱,表明更多无规则卷曲的出现。

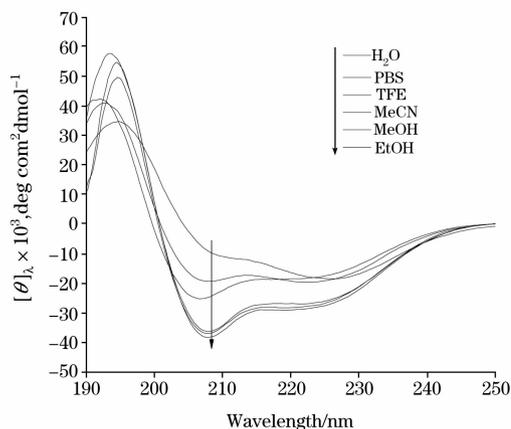


Fig. 1 CD spectra of trichokonin VI in different solvents

2.2 TFE 浓度对 Trichokonin VI 结构的影响

由于其溶剂分子和肽的疏水基团的相互作用,醇类,尤其是三氟乙醇可以有效地诱导螺旋结构的形成。为了得到有机溶剂对 Trichokonin VI 的二级结构的效果的详细信息,采用不同浓度的三氟乙醇水溶液来研究有机溶剂对 Trichokonin VI 的二级结构的影响,结果见图 2。从图 2 可以看出 TFE 可以有效地诱导螺旋结构的形成,并随着 TFE 浓度的提高,其峰的强度也增强,即其螺旋的含量增多。但超过 30% 的 TFE 对其峰的强度并没有明显的增加。TFE 能够改变非极性侧链间相互作用形成聚体^[7],也影响极性侧链间的 H^- 键的形成^[8]。这可能是 TFE 影响 Trichokonin VI 溶液中螺旋含量的原因。

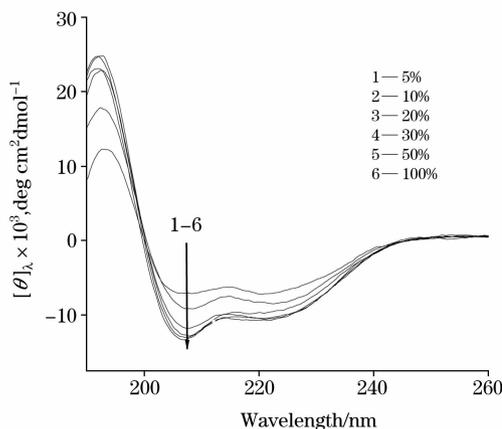


Fig. 2 CD spectra of trichokonin VI in different concentration of TFE

2.3 Trichokonin VI 浓度对其构象的影响

不同浓度的 Trichokonin VI 在 PBS 中的 CD 谱特征见图 3。由图 3 可以看出,Trichokonin VI 的 CD 谱在低浓度下随着浓度的提高峰形和强度的变化并不十分明显,但是高于 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,其峰的强度明显增强,在 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下,222 nm 左右的负峰显著增强,要强于 208 nm 的负峰。因此,在低浓度条件下,Trichokonin 的聚集不明显,而在高浓度的条件下,Trichokonin VI 以多聚体的形式存在。Tri-

chokonin VI 分子内有 8 个 Aib 残基, 3 个 Ala 残基和一个 Pro 残基, 其疏水性非常强, 因此在 PBS 溶液中具有浓度依赖性。

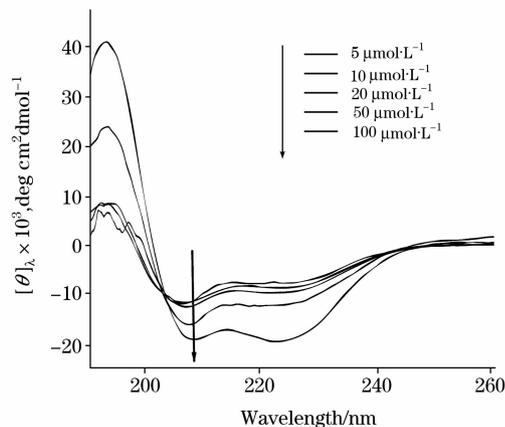


Fig. 3 CD spectra of trichokonin VI at different concentration

2.4 SDS 浓度对 Trichokonin VI 的二级结构的影响

去污剂提供了和膜相似的一个简单的亲水和疏水界面, 比有机溶剂更能代表膜的环境^[9, 10]。为了进一步研究膜拟态环境对 Trichokonin VI 构象的影响, 测定了含不同浓度的 SDS 的 PBS 缓冲液中 Trichokonin VI 的 CD 谱, Trichokonin VI 的构象变化见图 4。由图 4 可以看出, 在含 SDS 的溶液中 Trichokonin VI 具有 α -helical (α -螺旋) 的典型特征。随着 SDS 浓度的提高, 在 194 nm 左右的正峰和 208 及 222 nm 左右的负峰的强度都明显增强, 但是当去污剂的浓度在 1.6~2.0 mmol \cdot L⁻¹ 时其峰值变化很小。因此当 Trichokonin VI 大多连到了去污剂颗粒上后, 再增加其浓度, 并不会引起 CD 谱的明显变化。SDS 可以形成带负电的泡囊, 可作为细菌细胞膜中带负电的疏水性磷脂层的模拟。SDS 泡囊诱导多肽分子形成 α -螺旋结构可能是因为这种两性性的结构有利于 Trichokonin VI 在膜介质中的稳定存在。

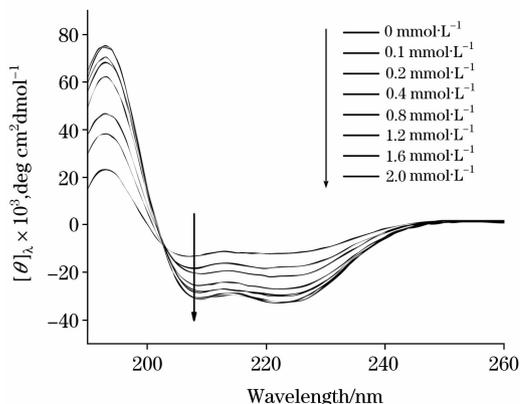


Fig. 4 CD spectra of trichokonin VI in different concentration of SDS

3 结 论

Peptaibols 是一类能够在脂双层膜上形成离子通道的真菌抗菌肽^[11-16]。研究最深入的是 alamethicin^[17]。Trichokonin VI 含有较多的 Aib, 因此其主要采用 α -helical 构象。Trichokonin VI 的二级结构对环境的变化特别敏感。虽然目前还缺少 Trichokonin VI 的 NMR 数据, 但 CD 谱特征表明, Trichokonin VI 在 MeOH, EtOH 和 MeCN 中主要以螺旋结构存在。在极性更强的有机溶剂中, 其螺旋的含量比在其他有机溶剂中降低, 可能转化为 3_{10} -helix, β -turn 或者无规则结构。随着 TFE 在溶液中含量的增加, 螺旋的含量增加, 但太高的浓度并不能使螺旋进一步增加。CD 光谱无法从 α -helix 中区分出 3_{10} -helix, 但是这种变化可能有利于分子的伸展, 使其分子间疏水面和亲水面的相互作用, 从而插入膜或形成通道^[18]。Trichokonin VI 的螺旋结构具有浓度依赖性, 高浓度的条件下可以诱导螺旋的增加。在去污剂颗粒中, CD 谱具有 α -helix 的典型特征, 因此膜可能是 Trichokonin VI 的作用位点。

参 考 文 献

- [1] SONG Xiao-yan, SHEN Qing-tao, XIE Shu-tao, et al(宋晓妍, 沈庆涛, 解树涛, 等). Chemistry of Life Science(生命的化学), 2005, 25(3): 184.
- [2] Chugh J K, Wallace B A. Biochemical Society Transaction, 2001, 29: 565.
- [3] Whitmore L, Wallace B A. The European Physical Journal, 2004, 33: 233.
- [4] Chen L L, Liu L J, Shi M, et al. FEMS Microbiology Letters, 2009, 299(2): 135.
- [5] Song X Y, Shen Q T, Xie S T, et al. FEMS Microbiology Letters, 2006, 260: 119.
- [6] Song X Y, Xie S T, Chen X L, et al. Journal of Biotechnology, 2007, 131(2): 209.
- [7] Bodkin M J, Goodfellow J M H. Biopolymers, 1996, 39: 43.
- [8] Luo P, Baldwin R L. Biochemistry, 1997, 36: 8413.
- [9] Blondelle S E, Lohner K, Aguilar M. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1462: 89.
- [10] Mao D, Wachter E, Wallace B A. Biochemistry, 1982, 21: 4960.
- [11] Chugh J K, Bruckner H, Wallace B A. Biochemistry, 2002, 41: 12934.
- [12] Ducholier H, Alder G M, Bashford C L, et al. Biophysical Journal, 2004, 87: 1705.
- [13] Ducholier H, Snook C F, Wallace B A. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1415: 255.

- [14] Grigoriev P A, Kronen M, Schlegel B, et al. *Bioelectrochemistry*, 2002, 57: 119.
- [15] O'Reilly A O, Wallace B A. *Journal of Peptide Science*, 2003, 9: 769.
- [16] Sansom M S, Balaram P, Karle I L. *The European Physical Journal*, 1993, 21: 369.
- [17] Reusser F. *Journal of Biology Chemistry*, 1967, 242: 243.
- [18] Sharman G J, Try A C, Williams D H, et al. *Biochemical Journal*, 1996, 320 (Pt3): 723.

Study on Conformation Transitions of Trichokonin VI, a Peptaibol-Like Antimicrobial Peptide, in Different Solvents by Circular Dichroism Spectroscopy

DONG Xiao-wei^{1, 4}, SONG Xiao-yan^{2, 3*}, SHI Mei², ZHANG Yu-zhong²

1. School of Life Sciences, Shandong Normal University, Ji'nan 250114, China

2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Ji'nan 250100, China

3. School of Medical and Life Science, Jinan University, Ji'nan 250223, China

4. Technology Center, Shandong Tobacco Industry Corporation, Ji'nan 250013, China

Abstract Trichokonin VI, a peptaibol-like antimicrobial peptides isolated from the cultured substrates of trichoderma koningii SMF2, has 20 amino acid residues. The conformational flexibility of trichokonin VI in organic solvents with different polarities, aqueous solvents and membrane mimic solvents was studied by circular dichroism spectroscopy. Trichokonin VI takes on a typical α -helical structure in different organic solvents, but helicity decreases in aqueous solvent. The helical content increases with increasing the concentration of TFE up to 30%. In phosphate buffered saline, the CD spectrum of trichokonin VI is concentration dependent, and the intensity of the peaks increases with increasing the concentration of trichokonin VI. SDS induces a significant transition towards a helix formation, and the CD spectra in membrane mimic solvents increase helicity compared with those recorded without membrane mimic solvents, suggesting the interaction of the peptides with the membrane.

Keywords Trichokonin VI; Peptaibol; Circular dichroism spectroscopy; Conformation

(Received Sep. 9, 2009; accepted Dec. 8, 2009)

* Corresponding author