

蜂毒肽对农作物病原菌的抑杀作用

潘凌子 那杰 邢卓 方宏筠 王关林*

(辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029. * 联系人, E-mail: guanlinwang@163.com)

摘要 采用牛津杯法和倍比稀释法研究了蜂毒肽对 19 种农作物病原菌和常见致病菌、基因工程菌的抑菌作用及其抑菌谱. 通过抑菌曲线分析蜂毒肽抑菌作用的影响因素. 利用 SDS-PAGE、细胞流式仪及透射电子显微镜等方法研究蜂毒肽的抑杀菌机理. 结果表明, 蜂毒肽的抑菌谱广, 对细菌、真菌都有强烈杀伤作用, 并具有速效性; 抑菌效果受 pH 及温度等主要因素影响. 蜂毒肽抑菌作用机理表现在 3 个方面: 与细胞膜结合, 使细胞膜破裂, 细胞内容物外泄死亡; 抑制蛋白质的表达与合成, 并使细胞质固缩; 使菌体细胞滞留在 (或 G₁) 期, 不能完成 DNA 复制从而抑制细胞分裂. 上述结果显示蜂毒肽具有成为速杀、高效、广谱生物农药的潜力.

关键词 蜂毒肽 农作物病原菌 影响因素 抑菌机理

蜂毒肽是一种膜翅目昆虫的抗微生物肽, 具有抗细菌、真菌、病毒的作用 [1-3]. 近年来对昆虫抗菌肽的研究十分重视, Zasloff [4] 于 2002 年综述了抗菌肽的研究进展、作用机理及其潜在的重大应用前景. 近年来抗菌肽对农作物病虫害的防治作用引起了研究人员的重视 [5-7]. 蜂毒肽一直以来是医药开发的热点 [3,8]. 我们经过多年的研究阐明了蜜蜂体内合成蜂毒肽的途径及机理, 实现了蜂毒肽基因在大肠杆菌中的表达, 为其基因工程生产打下基础, 也为蜂毒肽生物农药的设想提供了依据 [9,10]. 现有的生物农药多为缓效性和专一性, 使其在生产应用中受到一定的制约. 为研制出一种广谱速效的生物农药, 我们从蜂毒肽的基因工程药物开发转向其生物农药的研究, 试图将蜂毒肽基因导入农作物生防菌中, 并获得有效表达. 本文研究了蜂毒肽对农作物病原菌的抑菌作用、抑菌谱、最低抑菌浓度 (MIC) 及稳定性, 探讨了影响抑菌作用的诸多因素, 试述了蜂毒肽的杀菌机理. 该研究结果为蜂毒肽作为新型生物农药的应用提供理论依据.

1 材料和方法

() 材料. 蜂毒肽购自大连医药公司 (由大连白云山制药厂生产, 药准字 000568 号), 针剂注射液, 0.25 mg/mL. 农作物病原菌 (细菌和真菌) 由中国农业科学院植物保护研究所及沈阳农业大学农学院提供; 大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌

Staphylococcus aureus 由中国医学菌种保藏中心提供; 酵母工程菌 GS115 由大连 TaKaRa 生物公司提供.

() 蜂毒肽的浓缩. 采用抽真空技术将蜂毒肽针剂原液冷冻干燥制成粉末, 再用 0.09% NaCl 配制成为 0.5 和 1 mg/mL 溶液, 于 -80 保存备用.

() 菌株的培养条件. 除特殊指出的影响因素以外, 抑菌作用研究中所有条件均为菌体生长的最适条件, 即 *E. coli*, 37 , LB 培养基, pH 7.0; *S. aureus*, 37 , LB 培养基, pH 7.0; *Erwinia carotowora*, 28 , LB 培养基, pH 7.0; GS115, 30 , YPD 培养基, pH 5.8; *Fulvia fulva*, 28 , PDA 培养基, 不调 pH; 抑菌谱中各菌株培养也为最适条件.

() 抑菌谱的测定. 利用牛津杯法和液体倍比稀释法 [11] 进行细菌的最低抑菌浓度测定. 对真菌的测定: (1) 对孢子萌发的影响: 采用牛津杯法 [11]; (2) 对菌丝体生长的作用: 取在平皿上培养好的真菌菌丝块接种于 PDA 固体培养基上, 28 恒温培养至真菌菌落直径为 3 cm 左右, 在平板边缘放置牛津杯, 加入药液, 再置 28 恒温箱中继续培养, 直至出现明显抑菌圈为止.

() 蜂毒肽作用白菜软腐病菌抑菌曲线的绘制. 分成加药组和对照组两组. 加药组加入 2 mL 0.25 mg/mL 蜂毒肽及 2 mL LB 培养基, 对照组加入 2 mL 无菌水及 2 mL 肉汤培养基, 两组均加入 0.4 mL 已培养至对数生长期的白菜软腐病菌. 加药组与对照组同步继续培养, 分光光度计检测蜂毒肽作用后白菜

软腐病菌菌量的变化, 绘制抑菌曲线.

() 不同因素对蜂毒肽抑菌作用影响的测定. (1) pH. 利用牛津杯法测定蜂毒肽在 pH 为 1, 3, 5, 7, 9, 11 和 13 共 7 种不同 pH 情况下对 *Erwinia carotowora*, GS115 和 *Fulvia fulva* 的抑制作用. (2) 温度. 测定蜂毒肽在 23, 28, 33 共 3 个不同温度下白菜软腐病菌抑菌的曲线. (3) 蜂毒肽抑菌作用的稳定性. 将蜂毒肽存放于 37 温箱保温 5, 10, 20 d 后测定蜂毒肽对 *Erwinia carotowora*, GS115 和 *Curvularia lunata* 抑菌活性的变化情况.

() SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 按照 Leammli 系统配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 染色液为 0.5% 的考马斯亮蓝 [12]. 取无菌水冲洗 *Fulvia fulva* 得到 10^7 个/mL 孢子悬液 2 mL, 与 2 mL 蜂毒肽 (0.25 mg/mL) 作用 12 及 24 h 后取样, 以相同浓度的 2 mL 孢子悬液加入 2 mL 无菌水作为对照.

() 流式细胞仪分析 [13]. 取培养至对数期的 *Erwinia carotowora*, GS115 和 *Fulvia fulva* 菌液或孢子悬液各 2 mL, 与 2 mL 的蜂毒肽 (0.25 mg/mL) 混合, 作用 4 h (*Fulvia fulva* 孢子作用 24 h) 后经甲醛 (终浓度 2%) 固定, 生理盐水洗涤, PI 染色 (终浓度 200 μ g/mL) 处理. 正常菌液或孢子过夜培养后同上制备, 作为对照.

() 电子显微镜观察. 培养至对数生长期的白菜软腐病菌的液体培养基加入到浓度为 0.125 mg/mL 的蜂毒肽溶液 (0.4 mL) 中, 于摇床中培养 4 h 后离心收集菌体. 按照透射电子显微镜样品制备方法 [14,15], 于 JEM-2000EX 透射电子显微镜下观察菌体内部结构, 以正常培养的路原菌为对照.

() 数据处理及分析. 上述试验均进行 3 次重复, 将统计数据应用 Microsoft Visual Foxpro 软件进行 *t* 检验等处理, 并进行显著性分析.

2 结果与分析

2.1 蜂毒肽对农作物病原菌的抑菌作用及其抑菌谱

从图 1 中可以观察到蜂毒肽对白菜软腐病菌、马铃薯青枯病菌、苹果圆斑病菌及茄子黄萎病菌有明显的抑菌圈, 说明蜂毒肽对农作物细菌和真菌孢子均有抑制作用, 使孢子没能萌发成菌丝体. 图 1(c) 和 (d) 为蜂毒肽对真菌菌丝体的抑菌效果, 对照组无透明抑菌圈, 而用药组出现明显的抑菌圈. 这是由于蜂毒肽抑制真菌菌丝的生长, 使得蜂毒肽药液扩散的范围无法长出菌丝体. 采用倍比稀释法测定蜂毒肽对番茄叶霉病菌的 MIC, 结果表明, 蜂毒肽抑制孢子萌发及菌丝生长与其浓度呈正相关性. 当药物达到一定浓度时, 可以产生很强烈的杀菌作用. 表 1 表明, 蜂毒肽对测试的 19 种农作物病原菌及常见致病菌、基因工程菌 (作为对照组) 均有抑菌作用, 包括细菌性病原菌和真菌性病原菌, 尤其是对白菜软腐病菌和番茄叶霉病菌的抑菌效果非常显著, 只要很少的量 (微克) 就可以发挥作用, 它们的 MIC 值分别为 0.0078 和 0.0625 mg/mL. 各种菌株的对照组, 在牛津杯中只加无菌蒸馏水, 均无抑菌圈. 由此可见, 蜂毒肽几乎对各种农作物病原菌、致病菌及基因工程菌均有作用, 抗菌谱很广.

2.2 蜂毒肽对白菜软腐病菌生长的影响

在研究中观察到, 对照组细菌 24 h 内呈正常生长曲线, 加药组不能形成生长曲线, 且药物作用很快. 与对照组相比, 正常生长的白菜软腐病菌培养基中加入蜂毒肽 1 h 后其生长曲线明显变化 (图 2), 表明蜂毒肽使白菜软腐病菌菌量急剧减少, 在 64 min 内, A 值由 0.187 减少到 0.053, 说明蜂毒肽并非只是抑制菌体的生长, 更可能是直接迅速杀死细菌.

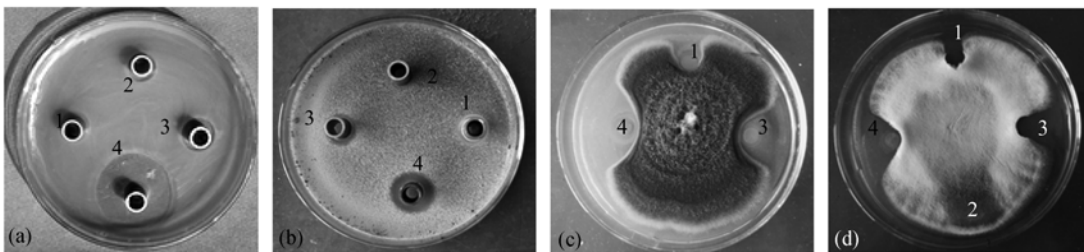


图 1 不同浓度的蜂毒肽对农作物病原菌的抑制作用

(a) 马铃薯青枯病菌 *P. solanacearum* BP; (b) 番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva*; (c) 苹果圆斑病菌 *Phyllosticta solitaria*; (d) 茄子黄萎病菌 *Verticillium dahliae*. 1, CK; 2, 0.25 mg/mL; 3, 0.50 mg/mL; 4, 1.00 mg/mL

表 1 蜂毒肽对各种病原菌的抑菌作用

菌株	不同浓度蜂毒肽时抑菌圈大小(抑菌圈半径/cm)			最低抑菌浓度/mg · mL ⁻¹
	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	
大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>)	1.3 ± 0.02	1.0 ± 0.05	0.5 ± 0.01	0.0156 ± 0.000001
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	2.4 ± 0.02	1.0 ± 0.01	0.9 ± 0.03	0.0039 ± 0.000001
藤黄微球菌(<i>Micrococcus luteus</i>)	0.9 ± 0.01	0.8 ± 0.00	0.75 ± 0.01	0.0078 ± 0.000002
短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)	1.2 ± 0.02	1.1 ± 0.00	0.9 ± 0.01	0.0078 ± 0.000000
番茄青枯病菌 QT (<i>P. solanacearum</i> QT)	1.0 ± 0.01	0.8 ± 0.00	0.6 ± 0.00	0.0082 ± 0.000000
马铃薯青枯病菌 BP (<i>P. solanacearum</i> BP)	1.0 ± 0.03	1.7 ± 0.03	0.5 ± 0.01	0.0085 ± 0.000001
番茄溃疡病菌 PV (<i>C. michiganense</i> PV)	0.7 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.0116 ± 0.000003
马铃薯环腐病菌 PVS (<i>C. michiganense</i> PVS)	0.5 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.0 ± 0.00	0.0150 ± 0.000005
玉米纹枯病(<i>Rhizoctonia solani</i>)	1.0 ± 0.02	0.9 ± 0.01	0.8 ± 0.01	0.1250 ± 0.000001
玉米弯孢叶斑病(<i>Curvularia lunata</i>)	1.2 ± 0.01	1.0 ± 0.02	0.8 ± 0.03	0.1250 ± 0.000005
玉米茎腐镰刀菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	1.1 ± 0.02	0.9 ± 0.01	0.8 ± 0.03	0.0625 ± 0.000001
玉米茎腐腐霉菌(<i>Pythiumaphanidermatum</i>)	1.1 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.8 ± 0.00	0.0625 ± 0.000001
白菜软腐病菌(<i>Erwinia carotowora</i>)	2.5 ± 0.04	1.0 ± 0.00	1.5 ± 0.01	0.0078 ± 0.000002
黄瓜枯萎病(<i>Fusarium oxysporum</i>)	0.9 ± 0.01	0.8 ± 0.00	0.8 ± 0.00	0.1250 ± 0.000005
黄瓜细菌性角斑病(<i>Pseudomonas syringae</i>)	1.8 ± 0.00	1.4 ± 0.04	0.9 ± 0.01	0.0156 ± 0.000001
番茄叶霉病(<i>Fulvia fulva</i>)	1.3 ± 0.00	1.0 ± 0.01	0.8 ± 0.00	0.0625 ± 0.000001
番茄灰霉病(<i>Botrytis cinerea</i>)	1.1 ± 0.02	0.9 ± 0.00	0.8 ± 0.02	0.0625 ± 0.000003
烟草赤星病(<i>Alternaria alternata</i>)	1.3 ± 0.01	0.9 ± 0.01	0.8 ± 0.02	0.0625 ± 0.000004
苹果圆斑病(<i>Phyllosticta solitaria</i>)	1.0 ± 0.00	0.8 ± 0.00	0.8 ± 0.00	0.1250 ± 0.000001
水稻恶苗病(<i>Fusarium moniliforme</i>)	1.2 ± 0.00	0.9 ± 0.02	0.8 ± 0.00	0.0625 ± 0.000000
茄子黄萎病(<i>Verticillium dahliae</i>)	0.9 ± 0.03	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.00	0.1250 ± 0.000001

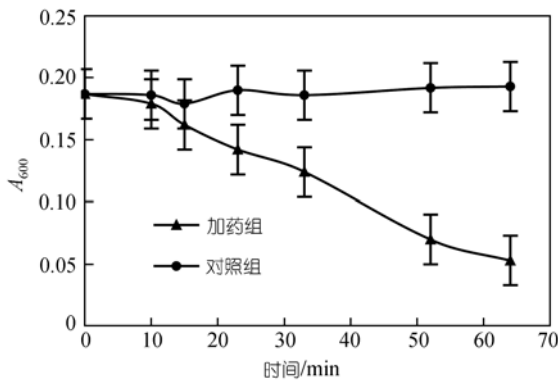


图 2 蜂毒肽作用白菜软腐病菌的抑菌曲线

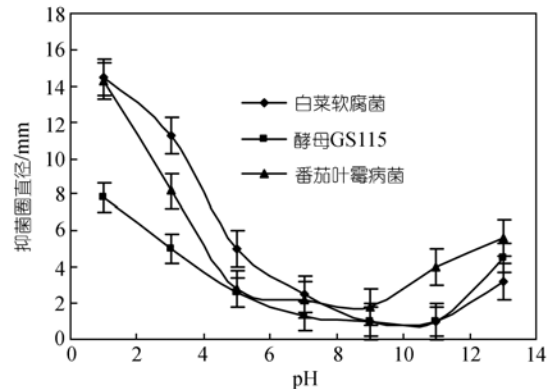


图 3 不同 pH 对蜂毒肽抑菌作用的影响曲线

2.3 不同因素对蜂毒肽抑菌的作用影响

() pH. 如图 3 所示, 蜂毒肽作用于 *Erwinia carotowora*, GS115 和 *Fulvia fulva*, 抑菌强弱是随着 pH 的不同而变化的. 蜂毒肽对细菌、酵母菌、真菌的抑菌圈大小都表现为: 强酸性情况抑菌作用最强, 强碱性情况抑菌作用次之, 中性时抑菌作用最弱. 而且, 蜂毒肽对不同菌株的作用存在差异: 随 pH 变化, 其对 *Erwinia carotowora* 抑制作用变化最为显著, 在 pH 7~11 时对酵母 GS115 几乎无抑制作用, 但在各 pH 时对 *Fulvia fulva* 均有抑制作用. 以相同 pH 梯度无菌

蒸馏水为对照, 牛津杯实验显示各菌株均无抑菌圈.

() 温度. *Erwinia carotowora* 的正常培养温度为 28 , 本研究选择了正常温度±5 作为实验温度. 从图 4 中可见, 在该温度范围内, 蜂毒肽的抑菌作用均十分显著. 在 80 min 内温度越高, 对照组 A 值增幅越大; 而加药组温度越高, A 值降幅越大. 即对照组繁殖速度越快, 加入蜂毒肽后菌体数量减少越快. 在一定范围内, 蜂毒肽对于温度不敏感.

() 蜂毒肽抑菌作用的稳定性. 从图 5 中可以观察到, 蜂毒肽 37 保温 5 d 后, 对 *Erwinia caro-*

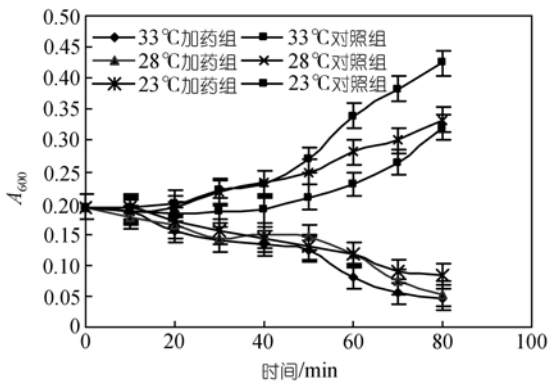


图4 不同温度下蜂毒肽作用白菜软腐病菌的抑菌曲线

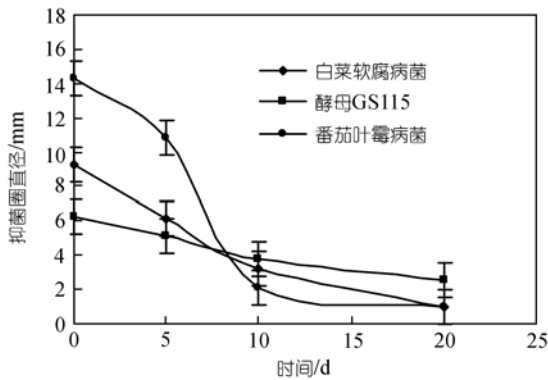


图5 蜂毒肽抑菌作用的稳定性曲线

towora, GS115和 *Fulvia fulva*的抑菌圈直径开始降低, 10 d后抑菌作用显著降低, 20 d时对3种菌株基本无抑制作用。

2.4 蜂毒肽对功能蛋白的影响

从图6可以看出, 正常金黄色葡萄球菌谱带多且

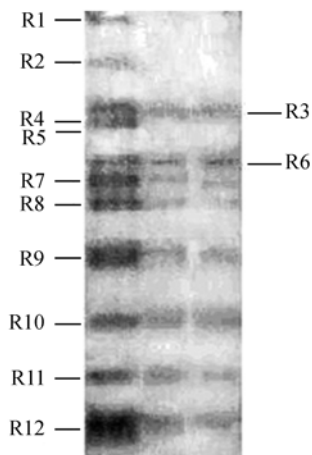


图6 金黄色葡萄球菌 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
1, 对照组金黄色葡萄球菌; 2和3分别为蜂毒肽作用3, 6h后金黄色葡萄球菌的谱带

清晰, 而蜂毒肽作用后, 有的蛋白谱带(如 R7, R8)变浅, 有的谱带(如 R1, R2, R4, R5)消失, 这种变化随时间延长表现得更为显著. 其中蛋白 R1, R2, R4, R5 谱带被极敏感地抑制, 与蜂毒肽作用3 h后即完全消失. 这说明正常菌体表达蛋白谱带与蜂毒肽作用下菌体表达蛋白谱带存在明显差异。

2.5 蜂毒肽对菌体分裂周期的影响

在原核细胞周期中, DNA 复制前的准备时期()相当于真核细胞的 G₁ 期; DNA 复制期(R)相当于真核细胞的 S 期; 原核细胞一旦 DNA 复制结束, 便立即进入细胞分裂(D)期, 没有为细胞分裂作准备的 G₂ 期. 流式细胞仪观察结果显示, 蜂毒肽作用4 h后位于期的菌体数量增加, 而进入 R 期的细菌数量减少. 以酵母菌 GS115 为例, 对照组进入 S 期菌量占总数的 61.75%, 而药物作用后只占 25.20%, 下降了大约 35% (图7中斜线覆盖区域代表 S 期). *Staphylococcus aureus* 和 *Fulvia fulva* 孢子经蜂毒肽作用后, 进入 DNA 复制期的菌体含量也呈下降趋势。

2.6 蜂毒肽白菜软腐病菌透射电子显微镜观察结果

从图8可见, 经蜂毒肽作用4 h后, 菌体变形, 细胞质固缩, 分布不均匀, 细胞膜穿孔或破裂, 观察到的最小孔洞直径只有 60 nm (图8(a)箭头所示), 细胞内膜同样逐渐解体, 细胞内容物外泄, 最终菌体裂解、死亡(图8(b)).

3 讨论

3.1 蜂毒肽抑杀菌的广谱性和速效性

从蜂毒肽对 19 种农作物病原菌的抑菌谱表明, 蜂毒肽对革兰氏阴性及阳性菌同样具有抑杀作用. 尤为可贵的是, 蜂毒肽不但对细菌性作物病原菌有抑杀作用, 而且对真菌性作物病原菌同样有明显的抑杀效果. 蜂毒肽既可以抑杀孢子的萌发, 又可以抑杀菌丝体的生长. 蜂毒肽对常见致病菌和基因工程菌同样具有强烈的抑杀作用. 本研究结果显示, 蜂毒肽具有广谱的抑杀菌作用. 从抑菌曲线可以看出, 在 64 min 内, 加药组的白菜软腐病菌生长曲线急剧下降, 这说明蜂毒肽迅速作用白菜软腐病菌, 使其菌量骤减, 显示其速效和高效性. 流式细胞仪检测表明, 加药后进入分裂期的细菌及真菌孢子明显减少. 电子显微镜观察进一步说明, 蜂毒肽并非是抑制白菜软腐病菌的生长, 而是通过破坏细胞膜直接毒杀菌体以达到抑杀菌的目的, 作用4 h后病原菌解体死亡,

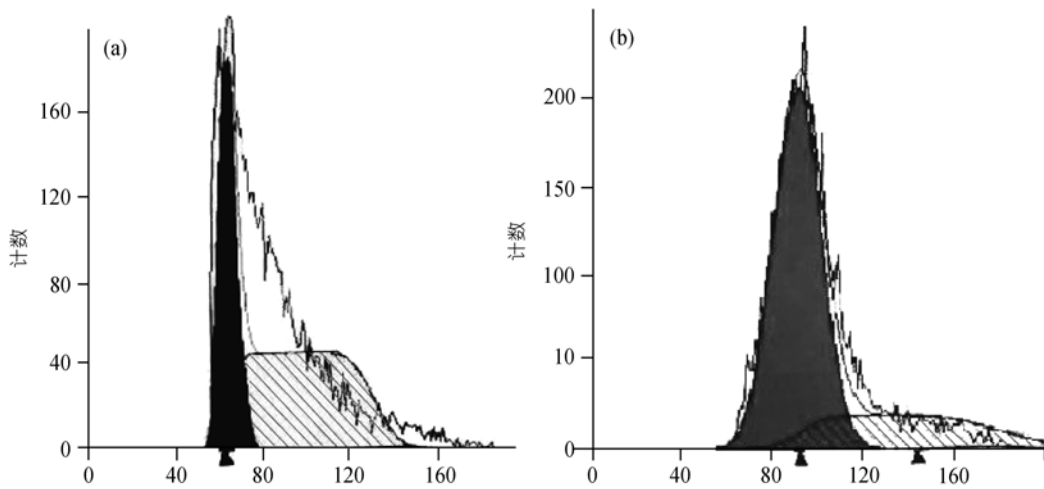


图 7 流式细胞仪观察蜂毒肽对酵母菌 GS115 细胞周期的影响
(a) 正常酵母 GS115; (b) 蜂毒肽作用 4 h 后的酵母 GS115

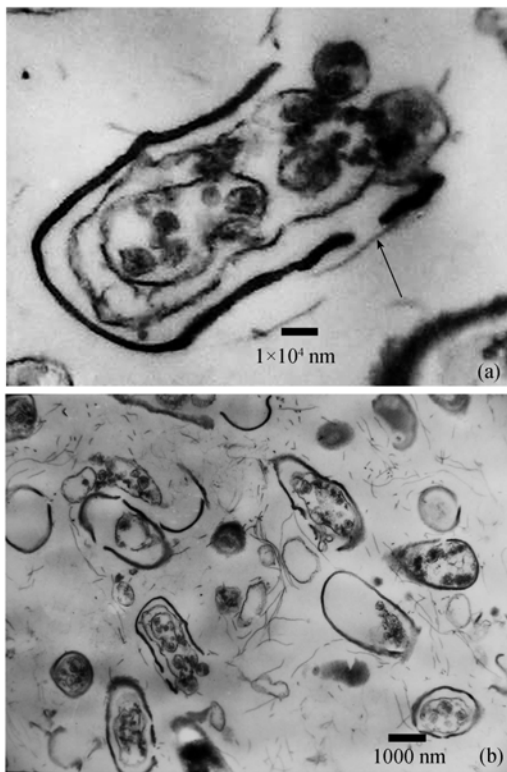


图 8 透射电子显微镜下蜂毒肽作用白菜软腐病菌的形态结构

(a) 药物作用 4 h 后的白菜软腐病菌($\times 30000$), 箭头所示为细胞膜破裂孔径; (b) 药物作用 4 h 后的白菜软腐病菌($\times 5000$)

表现了强烈的速效性. 蜂毒肽抑杀抗菌的速效性使其克服了其他生物农药缓效性的不足, 使生物农药像化学农药一样速效杀菌成为可能.

3.2 蜂毒肽抑杀菌的机理

关于蜂毒肽的抑杀菌机理已有许多研究报道, 但至今尚未彻底阐明. 本研究利用 SDS-PAGE、流式细胞仪和电子显微镜等方法, 从功能蛋白、DNA 复制的分子和细胞超微结构角度分析了蜂毒肽的抑杀菌机制. 经流式细胞仪分析, 蜂毒肽对菌体作用后, 集中于 (或 G_1) 期的细菌数量增加, 进入 R (或 S) 期细菌数量减少, 这说明药物作用发生在 I (或 G_1) 期, 而不是发生在 DNA 合成的 R (或 S) 期, 致使更多细菌滞留在 (或 G_1) 期. 药物作用下白菜软腐病菌生长曲线表明菌体没有进入对数生长期, 直接进入衰亡期. 而 SDS-PAGE 结果表明, 药物作用后菌体蛋白谱带明显变浅, 甚至消失, 而这种作用是速效的, 短时间内与药物作用时间呈正相关, 说明蜂毒肽能够抑制蛋白质合成或基因表达, 而且这种作用是在短时间内完成的. 其中最为敏感的是 R1, R2, R4, R5 谱带蛋白, 当蜂毒肽作用 3 h 后即完全消失. 而细胞流式仪观察结果可知, 蜂毒肽作用 4 h 后, 细胞分裂受到抑制. 可能这些蛋白的合成被抑制与分裂功能有关. 通过电子显微镜观察到经蜂毒肽作用 4 h 后菌体细胞穿孔或破裂, 细胞质外流, 菌体裂解死亡. 以上结果证实了蜂毒肽对菌体的抑杀作用机理有两个途径: 一是在膜上形成穿孔或膜裂解, 使细胞内容物外漏死亡, 该结果支持了打孔模型 [16]; 另一途径是抑制菌体内与调控细胞分裂有关的蛋白的合成, 使菌体细胞滞留在 (或 G_1) 期, 不能完成 DNA 复制从而抑制细胞分裂. 该结果是一个新的机理发现, 调控信号怎样传

导, 细胞膜上是否存在受体等问题尚需进一步研究.

蜂毒肽整个分子带6个正电荷, 肽中的3个赖氨酸和2个精氨酸残基使其成为强碱性肽. 在中性水溶液中, 蜂毒肽作为单体是以随机的卷曲结构存在的, 而随着pH以及离子强度的增高, 蜂毒肽自我交联, 形成 α -螺旋的四聚体结构^[17,18]. 研究中我们发现, 蜂毒肽的抑菌作用受到pH的影响, 中性环境下, 以随机卷曲结构存在的蜂毒肽几乎无抑菌活性; 随着pH增高, 蜂毒肽自我交联的加深, 抑菌活性显著增强.

3.3 蜂毒肽作为生物农药的可能性

本研究表明, 蜂毒肽对农作物病原菌不仅抑菌谱广, 而且速效、高效, 可克服现有生物农药存在的缓效性、低效性和抑菌谱窄等不足. 实验结果显示, 在室温范围内, 蜂毒肽的抑菌作用对温度不敏感, 在各季节均能显示出强效的抑菌作用; 37℃环境下, 蜂毒肽的抑菌作用5 d后开始下降, 10 d后显著降低, 5 d的高活性保证了作为生物农药杀菌效果, 10 d后活性的显著降低, 避免了出现与化学农药残留相似的生态问题. 对蜂毒肽的研究还表明, 其喷洒对作物生长发育无毒副作用, 而且对植物防御酶活性有促进作用. 用蜂毒肽浸种, 对种子萌发生长发育亦无毒副作用, 相反能提高萌发率^[19]. 这些结果表明蜂毒肽作为生物农药具有重大潜力. 但蜂毒肽资源缺乏, 价格昂贵, 显然难以实施, 有待于蜂毒肽基因工程的研究^[9,10]. 此外, 蜂毒肽强烈的杀菌作用对有益菌生长及生态环境的影响尚需深入研究.

综上所述, 蜂毒肽是一种无毒副作用的小肽, 又能像化学农药一样速效高效的抑杀病原菌, 通过进一步深入研究, 有望成为一种理想的生物农药.

参 考 文 献

- 1 卫应, 杨申, 江明华. 蜂毒的药理研究、临床应用及开发现状. 中国医院药学杂志, 2000, 20(11): 682—683
- 2 刘艳荷, 陈剩禄, 张传溪. 蜂毒溶血肽的研究进展. 昆虫知识, 2001, 38(6): 410—413
- 3 Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, et al. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. J Gen Virol, 1998, 79(4): 731—740
- 4 Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002, 415(24): 389—395 [DOI]
- 5 Rodríguez-Hernández M J, Saugar J, Docobo-Pérez J, et al. Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(1): 95—100 [DOI]
- 6 Yevtushenko D P, Romero R, Forward B S, et al. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. J Exp Bot, 2005, 56(416): 1685—1695 [DOI]
- 7 Ferre R, Badosa E, Feliu L, et al. Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5): 3302—3308 [DOI]
- 8 Han H J, Lee J H, Park S H, et al. Effect of bee venom and its melittin on apical transporters of renal proximal tubule cells. Kidney Blood Press Res, 2000, 23(6): 393—399 [DOI]
- 9 王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽前体蛋白 cDNA 的克隆及其融合蛋白的表达. 微生物学报, 2001, 41(2): 181—185
- 10 王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽基因的定点诱变及其在大肠杆菌中的表达. 遗传学报, 2000, 27(2): 176—183
- 11 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册. 北京: 科学出版社, 2001. 210—215
- 12 Leammli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature, 1970, 227: 680—685
- 13 聂大平, 李振国, 马荣, 等. 用流式细胞仪分析抗生素后效应中细菌的生物学特征. 中国抗生素杂志, 2002, 27: 613—615
- 14 朱丽霞. 生物学中的电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 1983. 11—72
- 15 汤雪明, 戴书文. 生物样品的环境扫描电子显微镜观察. 电子显微学报, 2001, 20(3): 217—223
- 16 Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462(1-2): 1—10 [DOI]
- 17 Bello J, Bello H R, Granados E. Conformation and aggregation of melittin: Dependence of pH and concentration. Biochemistry, 1982, 21(3): 461—465 [DOI]
- 18 Dempsey C E. The actions of melittin on membranes. Biochim Biophys Acta, 1990, 1031(2): 143—161
- 19 王关林, 邢卓, 潘凌子, 等. 蜂毒肽对农作物生理指标及防御系统酶影响的研究. 作物学报, 2006, 32(4): 594—596