



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111518182 A

(43)申请公布日 2020.08.11

(21)申请号 202010269834.8

(22)申请日 2020.04.08

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 马龙 董五辈

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 龚莹莹

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

C12N 15/29(2006.01)

A01N 37/46(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表1页 附图8页

(54)发明名称

来源于大刍草的抗菌肽SM-985及其应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体公开了来源于大刍草的抗菌肽SM-985及其应用,所述抗菌肽的序列为SEQ ID NO.2所示。SM-985可增加细菌细胞膜的渗透性,SM-985与细菌膜(革兰氏阴性或革兰氏阳性)结合的亲和力较高。用SM-985处理过的细菌SEM和TEM图像显示,细菌细胞膜出现损伤,细胞发生溶解,具有广谱、较强的抗菌活性。体内抗菌活性表明,SM-985可预防由丁香假单胞菌DC3000引起的番茄叶斑病感染。

1. 一种分离的来源于大刍草的抗菌肽,所述抗菌肽的氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示。
2. 编码权利要求1所述抗菌肽的核苷酸序列。
3. 根据权利要求2所述的序列,所述的序列为SEQ ID NO.1所示。
4. 权利要求1所述的抗菌肽或权利要求2所述的核苷酸序列在制备细菌抑菌剂中的应用。
5. 权利要求1所述的抗菌肽或权利要求2所述的核苷酸序列在制备植物细菌病生防剂中的应用。
6. 根据权利要求4或5所述的应用,所述的细菌为小麦苗枯病菌(*Clavibacterfangii.*)、番茄细菌性溃疡病菌(*Clavibactermichiganesis* subsp. *michiganesis.*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、丁香假单胞菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringaepv. tomato*)、青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum.*)、野油菜黄单胞菌栖绒毛草致病变种(*Xanthomonas campestris pv. holcicola.*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzaepv. oryzae*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。
7. 根据权利要求5所述的应用,所述的植物为番茄或烟草。

来源于大刍草的抗菌肽SM-985及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及来源于大刍草的抗菌肽SM-985及其应用。

背景技术

[0002] 抗菌肽 (AMPs) 是天然的小分子,由于它们是小分子,因此被认为是常规抗生素的最佳替代品之一,并且它们通常具有广泛的抗菌活性以及相对较低的细胞毒性。抗菌肽是先天免疫系统的一部分,它可由所有微生物产生,包括细菌 (Hassan et al., 2012), 动物 (Hancock and Scott, 2000) 和植物 (Benko-Iseppon et al., 2010)。抗菌肽是抵抗细菌感染的第一道防线 (Ebbensgaard et al., 2015), 植物抗菌肽是植物防御系统的模式,抗菌肽可以从种类繁多的花朵、种子、叶子、茎和根中分离出来,并且具有抗植物病原体的活性 (Nawrot et al., 2014)。大刍草不仅是一种植物,包括四个多年生和一年生玉米种 (Galinat, 1969)。大刍草和玉米拥有共同的祖先 (Doebley, 1992)。George Beadle提出玉米是驯化的大刍草形式,在过去的10000年中,墨西哥人选择的一些主要基因可能已经将大刍草转变为玉米 (Beadle, 1939) (Beadle, 1972)。育种计划和种质特征研究表明,与野生祖先相比,栽培植物对生物和非生物胁迫的抗性水平相对较低 (Rosenthal and Dirzo, 1997)。cDNA是由逆转录酶产生的mRNA的互补DNA拷贝,cDNA文库的构建是确定细胞和组织特异性基因表达的有力工具。由mRNA制备的cDNA,没有内含子之类的反向序列。因此,cDNA既反映可表达的RNA,又可反映基因产物(蛋白质) (Ying, 2004)。由于这些文库的规模大,可能达到几千个,因此针对抗菌肽的cDNA文库筛选非常具有挑战性。在我们实验室的cDNA文库中,通过枯草芽胞杆菌表达系统筛选抗菌肽 (Kong et al., 2018) (Wu et al., 2020),但是这种方法既费时又费钱。电子计算机预测是大规模筛选和鉴定新型潜在抗菌肽的一种省时,省钱的方法 (Liu et al., 2017)。结构良好的抗菌肽数据库为开发抗菌肽预测提供了良好的基础,过去几年中已经提出了许多预测方法 (F. et al., 2012),这些服务器基于不同的参数使用了几种算法 (Liu et al., 2017)。例如,CAMP_{R3}基于支持Support Vector Machines (SVM) Random Forests (RF) 和Discriminant Analysis (DA) 等算法开发了抗菌肽的预测工具。(Thomaset al., 2010)。

[0003] APD3提供了有关肽段发现时间表,分类,术语,词汇表,统计数据和计算工具的有价值的信息。APD可以有效地搜索,设计和预测抗菌肽 (Zhou and Huang, 2015)。DBAASP根据肽与阴离子膜相互作用的物理化学特性(例如疏水性,两亲性,净电荷)开发了一种新的简单预测算法 (Vishnepolsky and Pirtskhalava, 2014)。具有高含量正电荷氨基酸(如精氨酸)的抗菌肽具有较高的净电荷值,被称为阳离子抗菌肽 (CAMPs)。阳离子抗菌肽 (CAMPs) 具有多种有益的生物学特性,包括广谱抗菌活性,耐药性发展缓慢和作用迅速 (Ciurac et al., 2019)。具有 α -螺旋的抗菌肽是介导植物保护的重要因子 (Montesinos, 2007) (Keymanesh et al., 2009)。它们的主要作用机制是干扰病原体的外膜和质膜,膜破裂或形成孔导致细胞溶解 (Holaskova et al., 2014)。细菌性植物病害是造成农作物和农产品大量损失的原因,其控制主要依靠化学农药 (Agrios, 2004)。Ralstonia solanacearum可引起番茄枯

萎病 (Murthy et al., 2019), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 引起番茄细菌溃疡 (Tancos et al., 2013), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起白枯病 (Sharma et al., 2017), *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* 引起高粱细菌性红条病 (Navi et al., 2002)。 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 引起番茄细菌性斑点病 (Xin and He, 2013)。由于对环境的不利影响, 多种农药已被禁止使用。然而, 由于缺乏有效的化合物, 一些具有重要经济意义的植物病害面临管理困难。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种来源于大刍草的抗菌肽 SM-985, 所述抗菌肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2 所示。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供抗菌肽 SM-985 的应用, 该抗菌肽能用于制备成细菌抑菌剂, 特别是用于防治植物细菌病害。

[0006] 为了完成上述目的, 本发明采用如下技术方案:

[0007] 使用枯草芽孢杆菌 SCK6 感受态细胞构建大刍草 (*Zea mexicana* (Schrad.) Kuntze) cDNA 文库。通过计算机预测以及人工筛选, 最终筛选出 SM-985 为抗菌肽。

[0008] 所述抗菌肽 SM-985 的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2 所示; 编码其核苷酸序列优选的为 SEQ ID NO. 1 所示序列。

[0009] SEQ ID NO. 2 所示序列或是编码该序列的核苷酸序列在制备细菌抑菌剂中的应用, 所述的细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。

[0010] 以上所述的应用中, 优选的, 所述的细菌为小麦苗枯病菌 (*Clavibacter fangii*)、番茄细菌性溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)、野油菜黄单胞菌栖绒毛草致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *holcicola*)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 或大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

[0011] SEQ ID NO. 2 所示序列或是编码该序列的核苷酸序列在制备植物细菌病生防剂中的应用

[0012] 与现有技术相比, 本发明具有以下优点:

[0013] SM-985 是一种从大刍草中分离出一种新型的富含阳离子精氨酸的抗菌肽。SM-985 抗菌肽对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有广谱、较强的抗菌活性, 该抗菌肽通过破坏细菌细胞膜的通透性来抑菌。由于其广谱抗性, SM-985 可能对其他病原细菌包括人类的致病菌都有抗菌活性。SM-985 可以抑制丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 对本氏烟和番茄的侵染, 使得 SM-985 适合作为抗菌剂应用。

附图说明

[0014] 图1: SM-985 的 MLC 结果

[0015] 将所有指示菌 (革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌) 在磷酸钠缓冲液中用浓度 $\leq 2\mu\text{M}$ 的 SM-985 处理 4 小时后, 没有发现细菌生长。但是, 用无菌水处理后, 指示菌在对照中生长良好。

[0016] 图2:细胞膜完整性检测(PI染色)

[0017] 浓度 1×10^7 CFU/ml的指示菌(革兰氏阳性和革兰氏阴性)在用 $10 \mu\text{M}$ SM-985处理4小时后,细胞膜被破坏,对照没有荧光,说明细胞膜是完整的,PI染料的红色荧光表明膜已崩解。Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜观察到了PI的吸收。比例尺: $20 \mu\text{m}$ 。

[0018] 图3:细胞膜完整性定量分析(PI染色)

[0019] 用 $10 \mu\text{M}$ SM-985处理4小时后,指示菌(革兰氏阳性和革兰氏阴性)的PI吸收高度增加。蓝色圆点表示未染色的细胞,红色圆点表示染色的细胞。NC表示阴性对照,PC表示阳性对照。Cytoflex 1x测量了PI摄取,并通过CyExpert 2.4软件分析了数据。

[0020] 图4:FITC标记的SM-985的定位

[0021] 用 $4 \mu\text{M}$ FITC-SM-985处理4小时后,SM-985对指示菌细胞膜(革兰氏阳性和革兰氏阴性)具有很高的亲和力。FITC标签的绿色荧光表明SM-985和细菌膜之间存在相互作用。使用Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜观察结果。比例尺: 30 和 $3 \mu\text{m}$ 。

[0022] 图5:FITC-SM-985的细菌膜通透性

[0023] 指示菌细胞膜(革兰氏阳性和革兰氏阴性)在用 $10 \mu\text{M}$ FITC-SM-985处理4h后丧失了完整性。PI染料的红色荧光表明膜已被破坏。FITC标签的绿色荧光表明SM-985和细菌膜之间存在相互作用。使用Leica TCS SP5共聚焦显微镜观察结果。比例尺: 3 、 5 和 $10 \mu\text{m}$ 。

[0024] 图6:渗透法测定体内抗菌活性

[0025] 用 $5 \mu\text{M}$ SM-985处理4小时后,浓度 1×10^6 CFU/ml的PstDC3000失去了对本氏烟草上和番茄的致病力。(A)用无菌水处理的本氏烟草(对照)。(B)用SM-985处理的本氏烟草。(C)用无菌水处理的番茄(对照)。(D)用SM-985处理的番茄。48小时后本氏烟草和96小时后番茄的观察结果。

[0026] 图7:SM-985可防止番茄上的叶斑感染

[0027] 用 $5 \mu\text{M}$ SM-985处理浓度 1×10^6 CFU/ml的Pst DC3000,而对照用无菌水处理。将SM-985处理和对照均直接喷洒在番茄叶片(正反面)上,并在6天后观察到结果。(A)对照组叶片正面。(B)对照组叶片背面。(C)SM-985处理叶片正面。(D)SM-985处理叶片背面。红色箭头指向叶斑。

[0028] 图8:通过SEM和TEM研究细胞膜损伤

[0029] 用 $15 \mu\text{M}$ SM-985处理浓度 1×10^7 CFU/ml番茄溃疡病菌细菌悬浮液4小时。(A,C,E和G)细胞质膜完整且细胞在对照中正常。(B,D,F和H)SM-985导致细胞质膜受损和细胞裂解。日立SU8010扫描电子显微镜和日立H-7650透射电子显微镜观察到的结果。

[0030] 图9:SM-985对 CaCl_2 的盐敏感性测定。

[0031] 用 $5 \mu\text{M}$ SM-985处理浓度 1×10^6 CFU/ml细菌悬浮液4h,添加不同浓度的 CaCl_2 。加入 CaCl_2 后,SM-985的抗菌活性明显降低。 CaCl_2 和SM-985之间的关系是反比关系(A)番茄溃疡病菌(B)Pst DC3000。

具体实施方式

[0032] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规技术;所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。

[0033] 实施例1:

[0034] 大刍草 (*Zea mexicana* (Schrad.) Kuntze) cDNA文库的构建:

[0035] 大刍草cDNA文库的构建:总RNA提取,mRNA纯化,cDNA合成,将cDNA整合入载体pBE-S,转化入大肠杆菌感受态细胞HST08,转化枯草芽孢杆菌感受态细胞SCK6。从文库中随机选择菌落。PCR方案为95℃ 5分钟;95℃30s,55℃30s,72℃50s (28个循环) 和72℃10分钟。cDNA文库的质量通过凝胶电泳确定。

[0036] 大刍草的cDNA插入片段被克隆到枯草芽孢杆菌SCK6中,该cDNA文库由2500个单菌落组成。由于插入了cDNA,大多数随机选择的菌落带大小都超过500bp(空载体带大小),这表明cDNA文库的质量很高。整个cDNA文库的菌落PCR结果是表明超过2000个菌落的cDNA插入条带大小不同。测序结果显示2000个插入片段之间的相似性,为避免重复,去除了500个菌落。根据NCBI,MM GDB和玉米GDB的BLAST结果,cDNA插入与玉米属具有100%的相似性。

[0037] 通过计算机预测以及人工筛选,最终筛选出SM-985为抗菌肽,SM-985是由21个氨基酸组成的短肽。BLAST结果表明SM-985肽序列与其他抗菌肽没有相同的相似性,说明了SM-985是新发现的一种抗菌肽,所述抗菌肽SM-985的氨基酸序列为:GAGIGPGHRRTWRRWP RRRWR,对应的核苷酸序列为GGCGCAGGTATAGGGCCCGGCATCGACGGACCTGGCGGCGATGGCCGCGCCGCGTGGCGG。

[0038] 使用Fmoc SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis)方法以97%的纯度合成SM-985,由Genscript (USA) co.Ltd公司完成。该公司提供了有关肽表征的数据,包括质谱和HPLC数据。将SM-985肽粉末溶解在超纯水中,并根据以下公式计算原料浓度: $D = \frac{A}{B \times C}$

[0039] A:粉末重量(g),B:肽分子量(Da),C:溶剂体积(L)D:摩尔浓度。

[0040] 实施例2:

[0041] SM-985的抑菌谱及抑菌效果的测定:

[0042] 1) 本实施例使用的指示菌如下:

[0043] 革兰氏阳性菌:小麦苗枯病菌 (*Clavibacter fangii*), 番茄细菌性溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168;

[0044] 革兰氏阴性菌:丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) DC3000., 青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*), 野油菜黄单胞菌栖绒毛草致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *holcicola*), 水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21。

[0045] 使用Luria-Bertani (LB) 培养基培养黄单胞菌属,使用King's B (KB) 培养基培养假单胞菌属,并使用Nutrient agar (NA) 培养基培养其余细菌。非致病性指示菌(枯草芽孢杆菌168和大肠杆菌BL21)在37℃培养,而致病指示菌在28℃培养。

[0046] 2) 最小抑菌浓度测定 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 测定:

[0047] 根据琼脂和肉汤稀释方法 (Wiegand et al., 2008) 并作了一些修改,确定了针对八种指示菌的SM-985的MIC和MBC。对于每种指示菌,在28℃和37℃的Mueller Hinton Broth (MHB) 培养基中接种单菌落,分别用于致病性和非致病性指示菌。细菌培养物用MHB稀释至浓度 1×10^6 CFU/ml。首先制备含256μM SM-985的MHB储备液,并在PCR板中连续稀释成128、64、32、16、8、4μM 6个浓度。将指示菌添加到不同的SM-985稀释液中并设置不含SM-985的培

培养基作为对照,细菌细胞的终浓度 1×10^5 CFU/ml,另外设置一组既不含细菌又不含SM-985作为无菌对照,分别在28℃和37℃下培养8h,以分别检测致病和非致病指示菌。针对不同的SM-985浓度,对照和处理均做梯度稀释。将稀释液涂布在培养基平板上,并在相同条件下培养,直到生长对照中菌落长出。MIC是相对于对照抑制率达到80%的最小SM-985浓度(Wu et al.,2014b)。MBC是完全抑制指示菌生长的最低SM-985浓度(Kang et al.,2011)。

[0048] 针对所有指示菌测定了SM-985的MIC和MBC。革兰氏阳性菌*C.fangii.*,*C.michiganesis ssp.michiganesis.*,和*B.subtilis 168*的MIC为8 μ M,MBC是16 μ M。革兰氏阴性菌*X.campestris pv.holcicola.*,*X.oryzaepv.oryzae.*,*P.syringaepv.tomato DC3000.*,*R.solana cearum.*,和*E.coli BL21*的MIC分别为4 μ M,<4 μ M,<4 μ M,4 μ M和8 μ M,MBC分别为16 μ M,4 μ M,4 μ M,8 μ M和16 μ M(表1)。

[0049] 表1

指示菌		MIC (μ M)	MBC (μ M)
<i>C. fangii</i>	gram-positive	8 μ M	16 μ M
<i>C. michiganesis</i> ssp. <i>michiganesis</i>		8 μ M	16 μ M
<i>B. subtilis</i> 168		8 μ M	16 μ M
<i>X. campestris</i> pv. <i>holcicola</i>	gram-negative	4 μ M	16 μ M
<i>X. oryzaepv. oryzae</i>		< 4 μ M	4 μ M
<i>P. syringaepv. tomato</i> D C3000		< 4 μ M	4 μ M
<i>R. solanacearum</i>		4 μ M	8 μ M,
<i>E. coli</i> BL21		8 μ M	16 μ M

[0051] (<)表示在所有SM-985浓度下均无菌生长

[0052] 3) 最小致死浓度(MLC)测定

[0053] 对于每种指示菌,使用10mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0)制备细菌悬液(1×10^6 CFU/ml)。用终浓度分别为128、64、32、16、8、4和2 μ M的SM-985处理细菌悬液,用无菌水处理细菌悬液作对照,具体方法如下:处理和对照均分别在28℃和37℃下培养4h(每1h轻轻颠倒一次),来区分致病菌和非致病菌。培养后,按照上述浓度稀释处理组和对照组。将100 μ l稀释液(每板30-300CFU)分别涂布在培养基板上,并做三组重复。将板全部温育,直到指示菌在

28℃和37℃形成可见的菌落,以此来确定MLC,最低浓度的SM-985在处理的平板中没有可见的生长菌落。该实验独立进行了三次。

[0054] 所用指示菌,革兰氏阳性菌(*C.fangii*.,*C.michiganensis* subsp.*michiganensis*., and *B.subtilis* 168)和革兰氏阴性菌(*X.campestris* pv.*holcicola*., *X.oryzae*pv.*oryzae*.,*P.syring* aepv.*tomato* DC3000.,*R.solanacearum*.,*E.coli* BL21),细菌浓度 1×10^6 CFU/ml。用SM-985处理的细菌平板(处理组)在浓度128、64、32、16、8、4和2 μ M下均未生长。而对照组则正常生长。因此,SM-985的MIC $\leq 2\mu$ M,不会对所有细菌指示剂造成可见的菌落(完全杀灭)(图1)。计数对照板上长出的所有指示菌(表2)。

[0055] 表2

指示菌	对照组 (10^5 CFU/ml)	SM-985 (10^5 CFU/ml)
<i>C. fangii</i>	10.06 \pm 1.51	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	13.87 \pm 0.13	-
<i>B. subtilis</i> 168	12.51 \pm 2.50	-
[0056] <i>X. campestris</i> pv. <i>holcicola</i>	12.98 \pm 1.27	-
<i>X. oryzae</i> pv. <i>orezae</i>	16.33 \pm 3.60	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	17 \pm 2.25	-
<i>R. solanacearum</i>	16.68 \pm 2.69	-
<i>E. coli</i> BL21	16.16 \pm 3.12	-

[0057] 计算每种指示菌的CFU/ml平均值。SM-985浓度为2 μ M,细菌浓度为 1×10^6 CFU/ml,无菌水作对照。

[0058] 实施例3:

[0059] SM-985的抑菌机理:

[0060] 1) SM-985通过增加细菌细胞膜通透性来抑菌:

[0061] 根据Van de Velde等人的研究,可通过碘化丙啶(PI)的摄取来分析细胞质膜的损伤(Van De Velde et al.,2010)。对于每种指示菌,使用10mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0)制备浓度 1×10^7 CFU/ml的细菌悬浮液。用10 μ M的SM-985处理细菌悬浮液,用无菌水处理具有相同体积的细菌悬浮液,作为对照。处理和对照均分别在28℃和37℃下培养4h(每1h轻轻倒置一次),以区别检测致病性和非致病性指示菌。培养后,加入终浓度10 μ g/ml的PI染料于处理和对照离心管中,并在黑暗条件下培养15分钟。细菌细胞用10mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0)于

5000rpm离心洗涤两次,以除去PI残留物,然后重悬于缓冲液中。使用Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜(Wang et al.,2017)和流式细胞仪Cytoflex 1x(Beckman Coulter,Brea, CA,USA)(Kwon et al.,2019)分别观察和测量PI摄取。激发和发射波长分别为535nm和617nm。使用CyExpert 2.4软件分析流式细胞仪数据。

[0062] 细胞膜损伤是由PI染料摄取决定的,PI染料只能进入受损的细胞。该实验是对革兰氏阳性菌*C.fangii.*,*C.michiganensis* subsp.*michiganensis.*和*B.subtilis* 168以及革兰氏阴性菌*X.oryzae*pv.*oryzae.*,*P.syringae*pv.*tomato* DC3000.,*R.solanacearum.*和*E.coli* BL21设计的。细胞膜的损伤通过Cytoflex 1x流式细胞仪测量。有两个对照,阴性对照是既没有SM-985也无PI染料的细菌细胞,阳性对照没有SM-985但有PI染料的细菌细胞。通过Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜可以观察到PI的吸收。10 μ M SM-985和对照处理的细胞均用PI染料处理。

[0063] 结果显示,用SM-985处理过的细菌细胞被PI染色,并出现PI染料的红色荧光,而对照细菌细胞未被PI染色(图2)。SM-985破坏了细菌细胞膜,与阴性和阳性对照相比,处理组增加了PI摄取的百分比(图3)。

[0064] 扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM):

[0065] 该实验以*C.michiganensis* subsp.*michiganensis*作为指示菌,制备细菌悬浮液($\sim 1 \times 10^7$ CFU/ml),并用15 μ M SM-985处理,而对照用无菌水处理。将处理组和对照组均在28 $^{\circ}$ C下培养4h(每1h轻轻倒置一次)。根据Wu等人(Wu et al.,2014a)的方法,对细菌细胞(处理/对照)进行了SEM的制备,并进行了一些修改,并以相同的方式进行处理。培养后,收集细菌细胞,然后在室温下用2.5% (v/v) 戊二醛溶液固定2小时。然后除去固定液,并用10mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0)洗涤细菌细胞两次。细菌细胞用30%、50%、70%、90%和100%梯度的乙醇溶液脱水。将细菌沉淀物在空气中干燥20分钟,然后通过冷冻干燥器干燥24h,直到其变成粉末。将细菌细胞冻干并用金粉包被,然后通过HITACHI SU8010扫描电子显微镜观察。然后将样品送至华中农业大学预测分析中心制备样品,并用日立H-7650透射电子显微镜观察细菌细胞。

[0066] SM-985对细菌细胞膜造成了明显破坏:

[0067] 根据先前的结果,确定了SM-985通过增加细胞膜的渗透性而引起细胞膜的损伤。此外,通过FITC-SM-985证实了SM-985与细菌细胞膜之间的相互作用。用SM-985处理细菌细胞后,观察细胞膜损伤。SEM图像观察结果表明经SM-985处理的*C.michiganensis* subsp.*michiganensis*细胞,细胞膜受到损伤,相比之下,对照细胞的细胞膜看起来完整且规则(图8)。此外,TEM图像观察到了*C.michiganensis* subsp.*michiganensis*细胞裂解,细胞膜受损以及细胞质流出。相反,对照细胞的细胞膜完整,光滑,并且细胞内细胞质未流出(图8)。

[0068] 2) FITC标记的SM-985对细菌的抑菌能力的影响

[0069] (1) FITC-SM-985与细胞膜的相互作用

[0070] FITC标记的SM-985(FITC-SM-985)合成是由Genscript(USA)公司完成的,按照步骤1)的方法,使用了4 μ M FITC-SM-985代替SM-985进行相同的细胞膜完整性测定实验。与FITC-SM-985一起温育后,细菌细胞用10mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0)冲洗,以除去肽残留物并重悬于缓冲液中。使用Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜,分别在激发和发射波长488nm和500-530nm处观察FITC的荧光。

[0071] 使用FITC标记SM-985,来了解SM-985作为抗菌肽的作用机理。细菌细胞用低浓度的FITC标记的SM-985处理3小时。革兰氏阳性菌*C.fangii.*,*C.michiganesis* subsp.*michiganesis.*和*B.subtilis* 168以及革兰氏阴性菌*X.campestris* pv.*holcicola.*,*X.oryzae*pv.*oryzae.*,*P.syringa*pv.*tomato* DC3000.,*R.solanacearum.*和*E.coli* BL21,均在Olympus BX61激光扫描共聚焦显微镜下显示绿色荧光(图4)。这些结果表明,FITC-SM-985与细菌细胞膜具有相互作用。

[0072] (2) FITC-SM-985的抑菌能力

[0073] 为了研究FITC标签对SM-985抗菌活性的影响,对*C.michiganesis* subsp.*michiganesis*和*P.syringa*pv.*tomato* DC3000进行了细胞毒性试验。两种指示菌悬浮液(1×10^6 CFU/ml)均用5 μ M FITC-SM-985处理4h,而对照用无菌水处理。培养后,进行梯度稀释。将100 μ l的稀释液(每板30-300CFU)涂布在培养基板上,并做三组重复。将板全部培养,直到在28 $^{\circ}$ C长出可见的菌落。用FITC-SM-985处理过的平板(处理平板)没有任何菌落生长,而在对照平板中,两种指示菌均长出了菌落(表3)。此外,进行了细胞膜完整性实验以测定10 μ M FITC-SM-985肽对七种指示菌的抗菌活性。用PI对革兰氏阳性菌*C.fangii.*,*C.michi ganesis* subsp.*michiganesis.*和*B.subtilis* 168以及革兰氏阴性菌*X.campestris* pv.*holcicola.*,*X.oryzae*pv.*oryzae.*,*P.syringa*pv.*tomato* DC3000.,*R.solanacearum.*,and *E.coli* BL21进行染色。用10 μ M FITC-SM985肽处理每种细菌悬液(1×10^7 CFU/ml)后,观察到细菌细胞同时显示FITC的绿色荧光和PI染料的红色荧光(图5)。

[0074] 表3

指示菌	Control (10^5 CFU /ml)	SM-985 (10^5 CFU /ml)
[0075] <i>C. michiganesis</i> subsp. <i>michiganesis</i>	13.69 \pm 1.66	-
<i>P. syringa</i> pv. <i>tomato</i> D C3000	14.70 \pm 2.22	-

[0076] 计算每种指示菌的CFU/ml平均值。SM-985浓度为2 μ M,细菌浓度为 1×10^6 CFU/ml,无菌水作对照。

[0077] 实施例4:

[0078] SM-985在制备成植物生防剂中的应用:

[0079] 该实验选择致病菌*P.syringa*pv.*tomato* DC3000和两个寄主本氏烟(*Nicotiana bentha miana*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)作为植物材料。本氏烟在24 $^{\circ}$ C(14小时光照,10小时黑暗)的生长室中培养5周(Yang et al.,2018),而番茄在28 $^{\circ}$ C(14小时光照,10小时黑暗)上培养6周,并制备Pst DC3000的悬浮液(1×10^6 CFU/ml)。用两种方法测定抗菌肽对病原菌侵染寄主的影响。

[0080] 第一种,在处理组中,将SM-985以5 μ M的终浓度添加到Pst DC3000悬浮液中,而在对照组中,用无菌水处理Pst DC3000。处理和对照均在28 $^{\circ}$ C下培养4h(每1h轻轻颠倒一次)。

培养后,使用浸润法((Vandenbossche et al.,2013) (Van De Velde et al.,2010) 在本氏烟草(Nicotiana glauca)和番茄植物上接种Pst DC3000(处理/对照)。2天后在本氏烟草上发现超敏反应,而4天后在番茄上发现坏死症状。

[0081] 第二种方法仅对番茄(S.lycopersicum)进行实验,并遵循与上述相同的步骤。但是,病原菌的培养方法不同,直接接种在番茄上。处理和对照都直接喷在植物叶片的正反面,6天后发病。两种方法均重复三次。

[0082] SM-985的抗菌活性结果:

[0083] P.syringaepv.tomato DC3000能引起番茄(S.lycopersicum)的叶斑病,并引起本氏烟草的超敏反应(HR),用5 μ M SM-985处理Pst DC3000细菌悬浮液(1×10^6 CFU/ml)4h,而对照用无菌水处理。采用浸润法,接种处理组和对照组的两个宿主。经SM-985处理的Pst DC3000不能在番茄上致病,也不能在本氏烟草上诱导HR反应。相比之下,对照Pst DC3000分别在4天和2天后在番茄和烟草上引起发病症状(图6)。

[0084] 为了模拟叶斑病的真实感染状况,将SM-985以终浓度5 μ M加入Pst DC3000细菌悬浮液(1×10^6 CFU/ml)中,然后直接喷洒在番茄叶片上。用SM-985处理的没有表现出发病症状,而对照组的叶片正面和背面有发病症状(图7)。

[0085] 实施例5:

[0086] CaCl₂对SM-985抗菌活性测定的影响:

[0087] 根据Van de Velde等人的方法(Van De Velde et al.,2010)测定盐离子对SM-985的影响,实验材料两个指示菌,革兰氏阳性菌C.michiganensis subsp.michiganensis和革兰氏阴性菌P.syringaepv.tomato DC3000。制备细菌悬浮液(1×10^6 CFU/ml),并将CaCl₂以四种不同的终浓度0、5、10、20mM添加到细菌悬浮液中。将5 μ M SM-985添加到具有四个CaCl₂浓度的细菌悬浮液中。然后将它们在28 $^{\circ}$ C下培养4小时,培养后进行梯度稀释,将100 μ l的稀释液(每块板可得到30-300CFU)涂布在培养基板上,每组三个重复。然后在28 $^{\circ}$ C下培养平板,直到长出菌落。CaCl₂对SM-985活性的影响通过计算每个盐浓度下细菌的CFU。该实验重复三次。

[0088] CaCl₂抑制SM-985抗菌活性:

[0089] 加入氯化钙盐会影响SM-985肽的活性。结果表明,在0mM CaCl₂中,SM-985活性非常强,没有可见的菌落长出。但是,加入5mM CaCl₂后,SM-985活性明显下降。观察到CaCl₂浓度与SM-985活性之间是反比的关系。因此,10mM CaCl₂浓度下,菌落增长多于5mM,而20mM引起的菌落增长多于10mM,增加CaCl₂浓度会降低SM-985的抗菌活性,并导致更多的菌落生长(图9)。

序列表

<110> 华中农业大学

<120> 来源于大刍草的抗菌肽SM-985及其应用

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ggcgcaggta tagggcccgg gcatcgacgg acctggcggc gatggccgcg cgcgccgttg 60
cgg 63

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Gly Ala Gly Ile Gly Pro Gly His Arg Arg Thr Trp Arg Arg Trp Pro

1 5 10 15

Arg Arg Arg Trp Arg

20

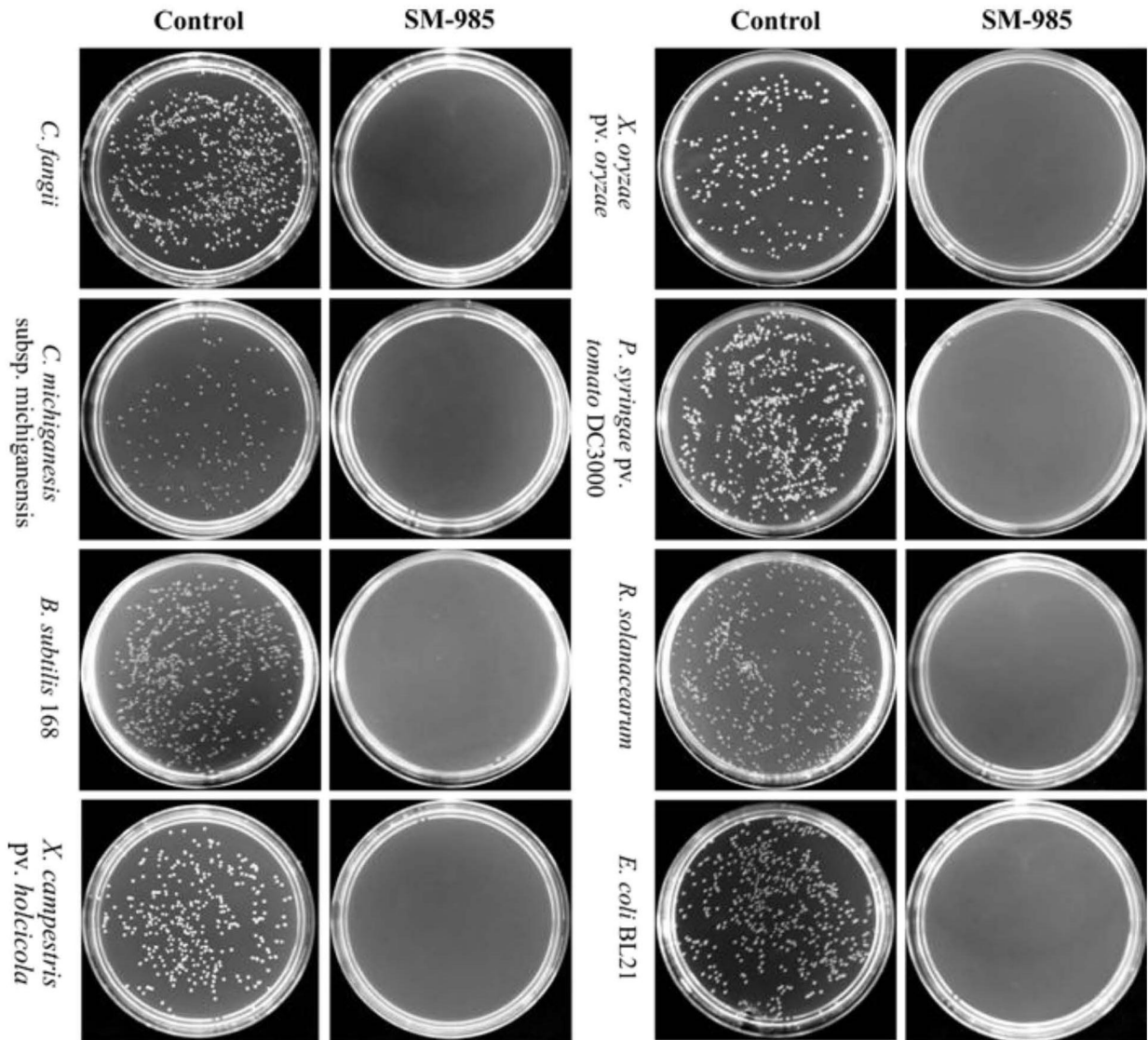


图1

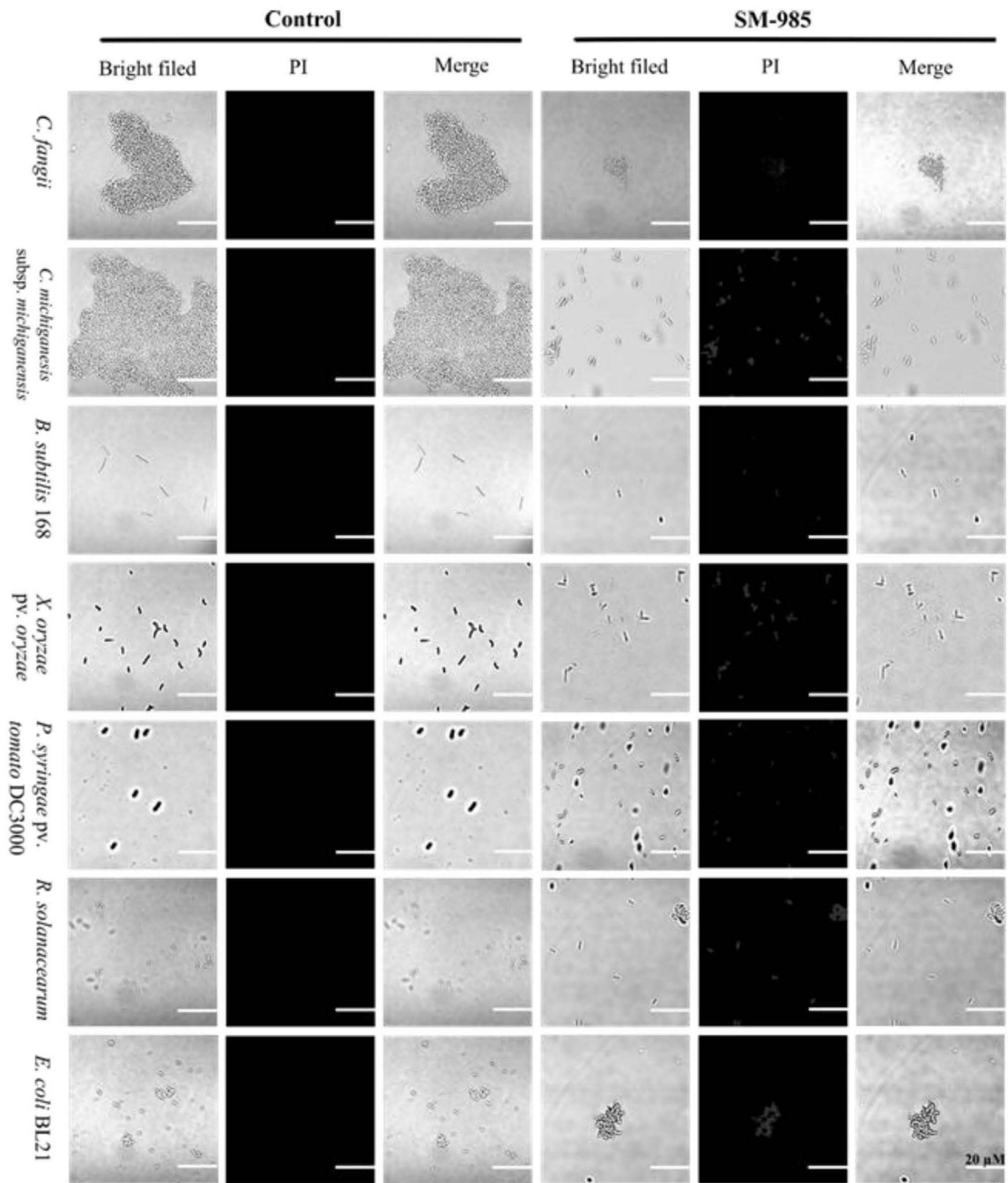


图2

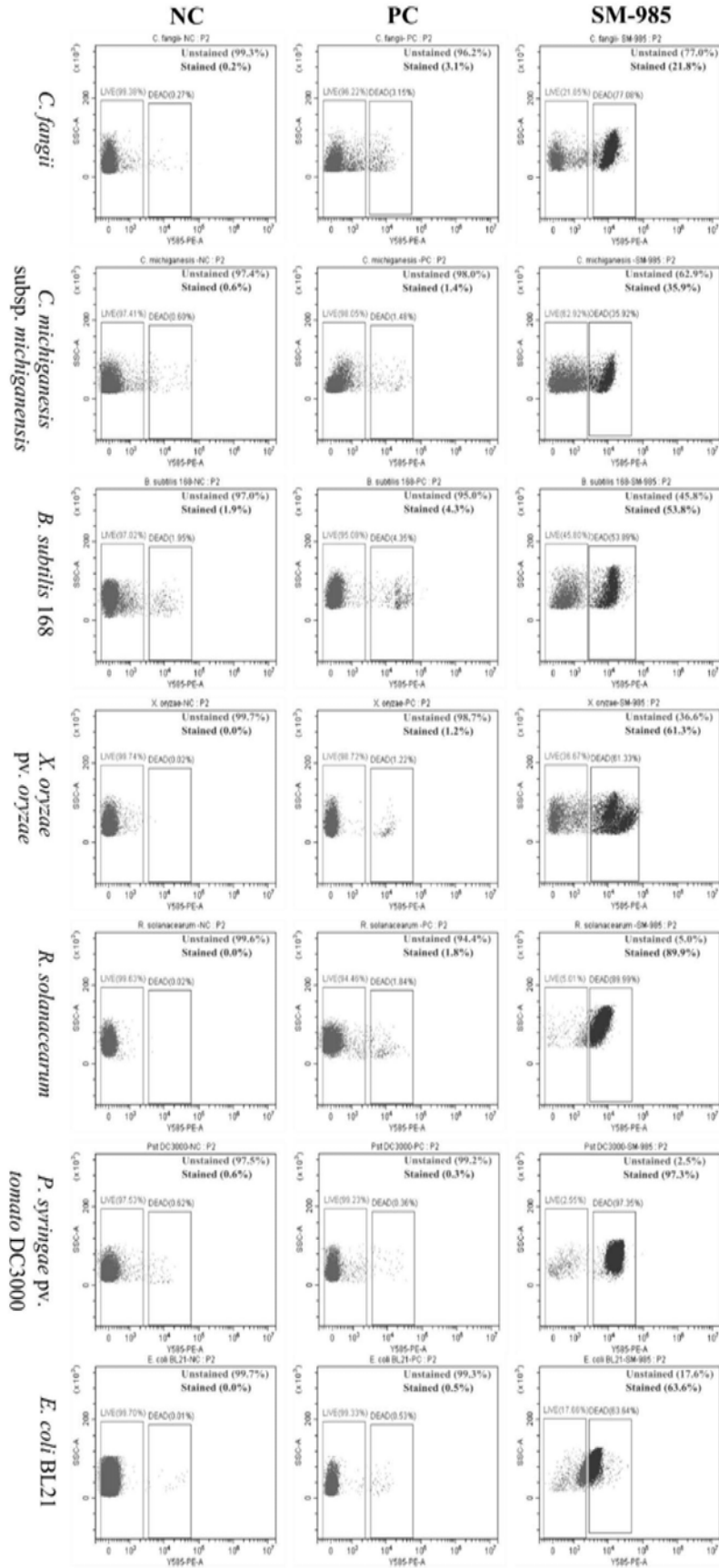


图3

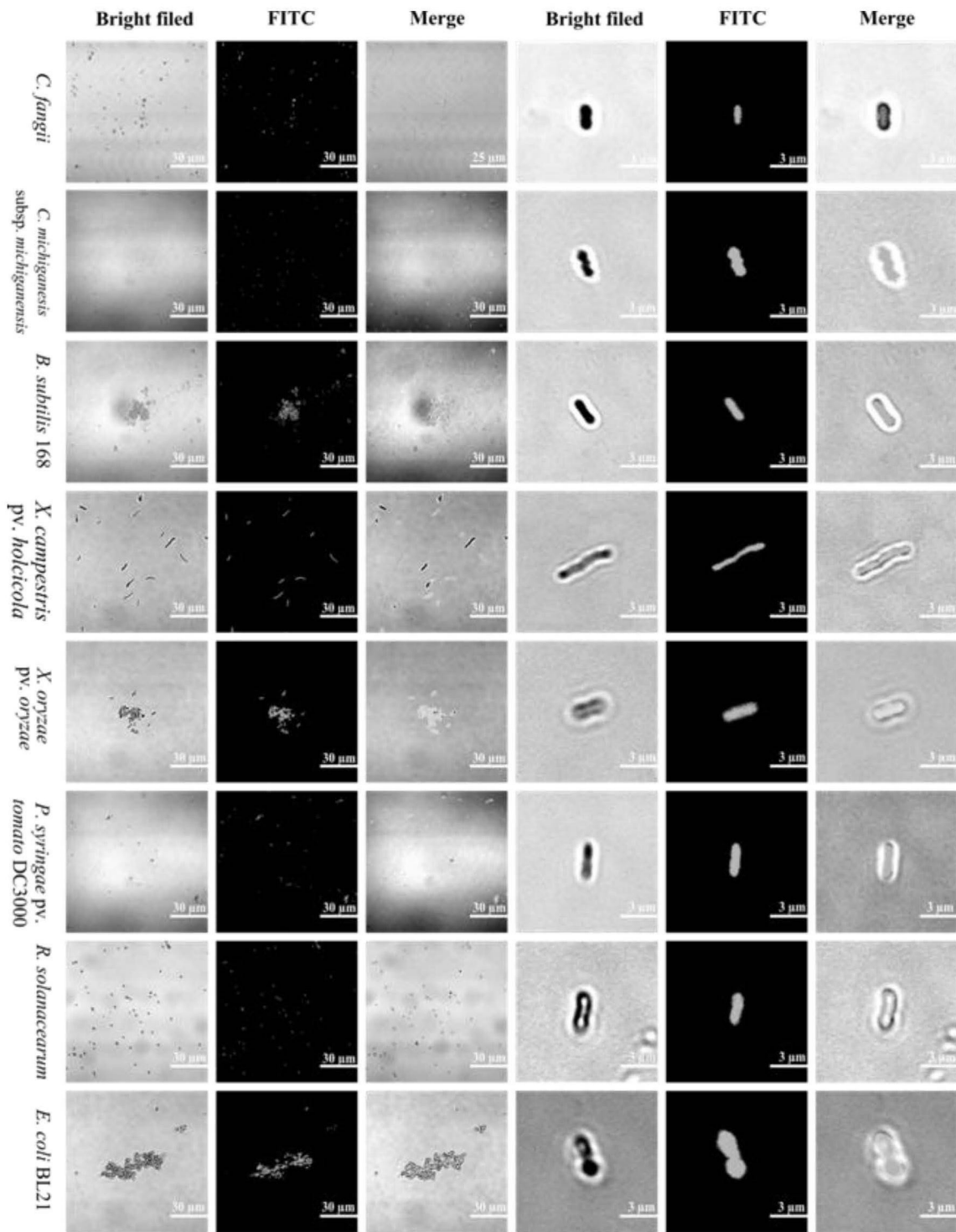


图4

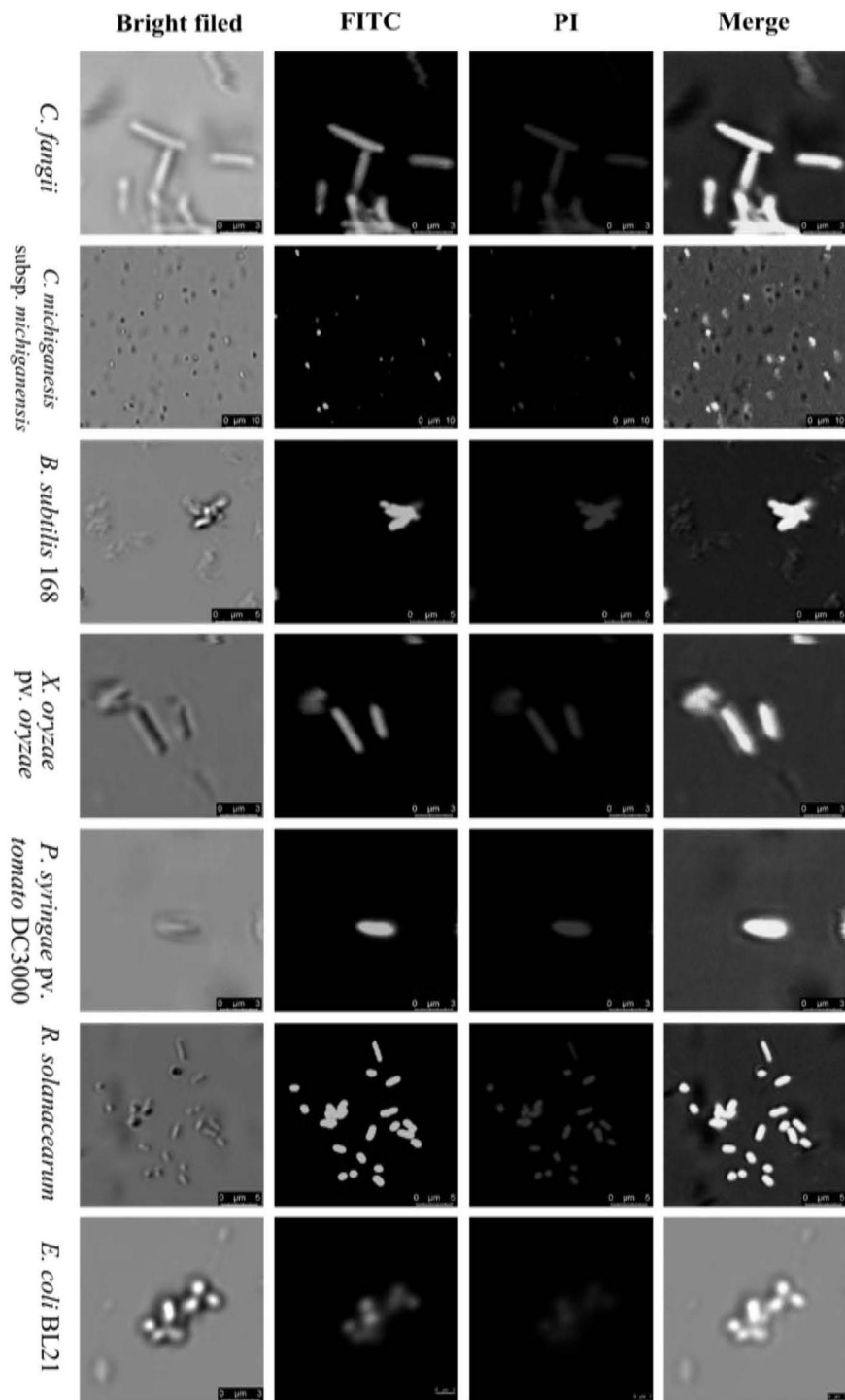


图5

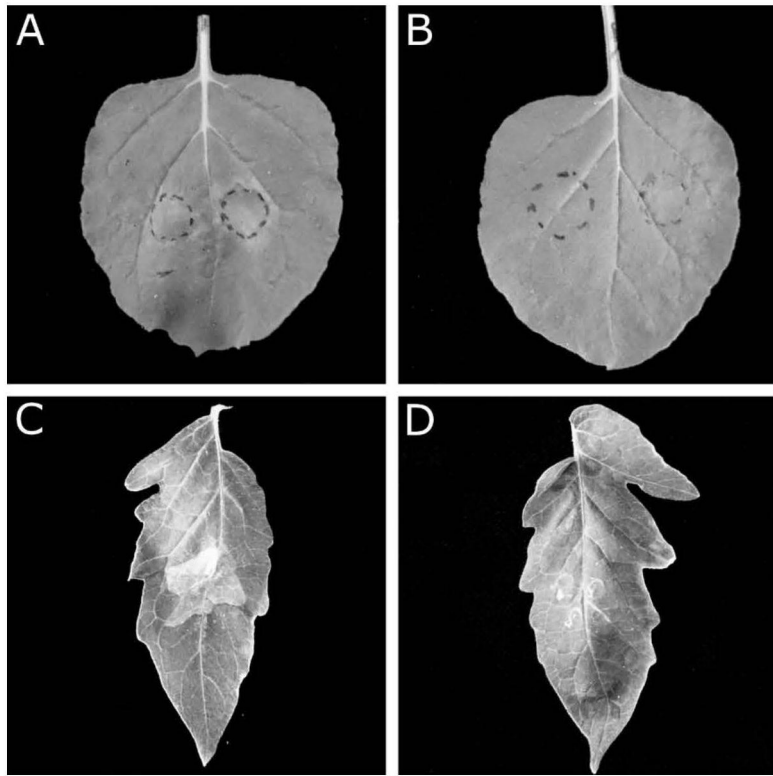


图6

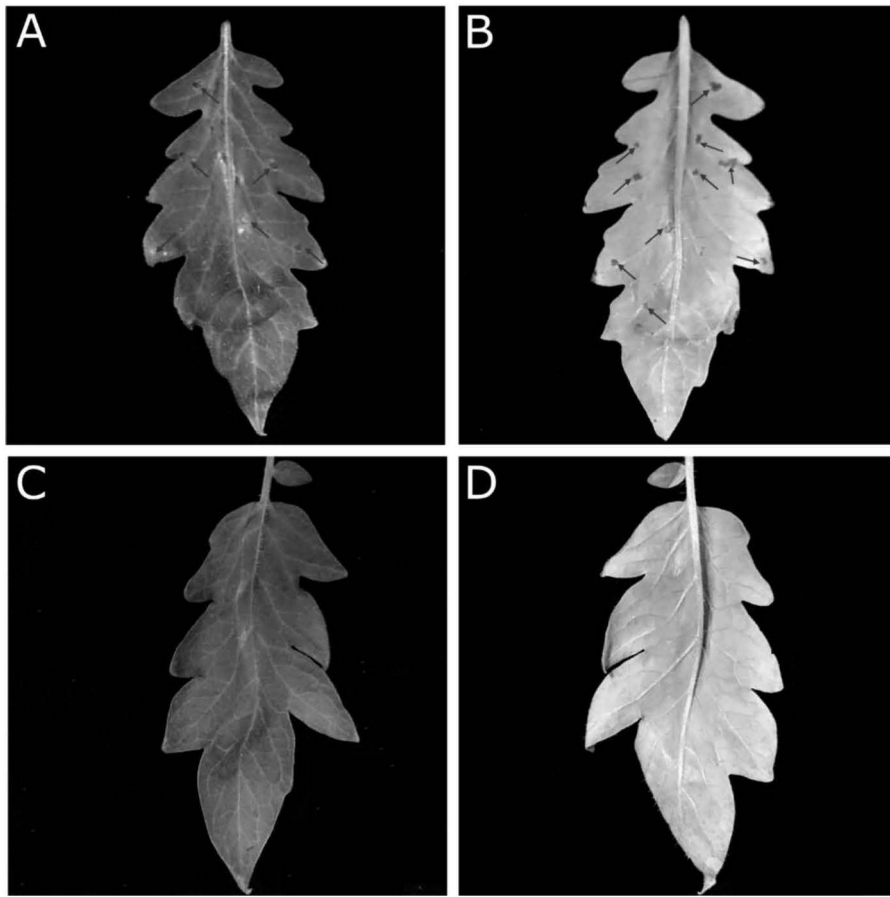


图7

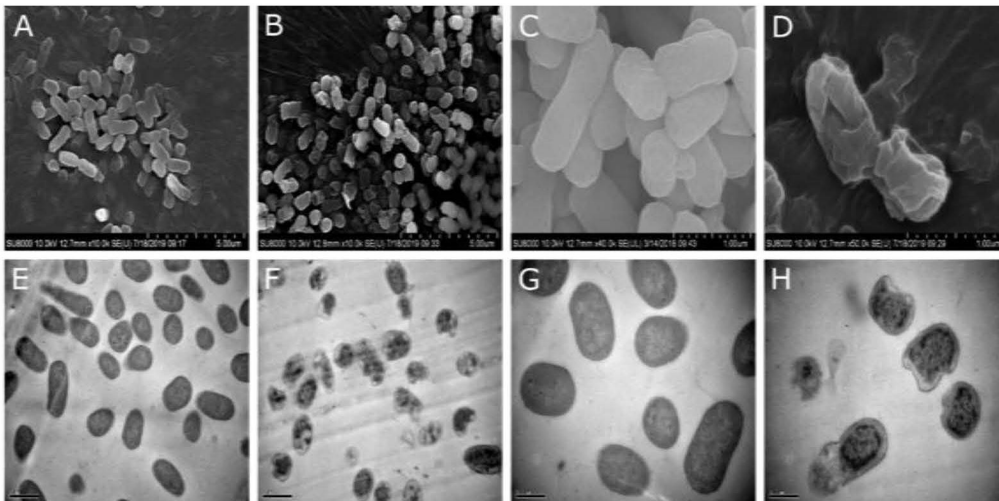


图8

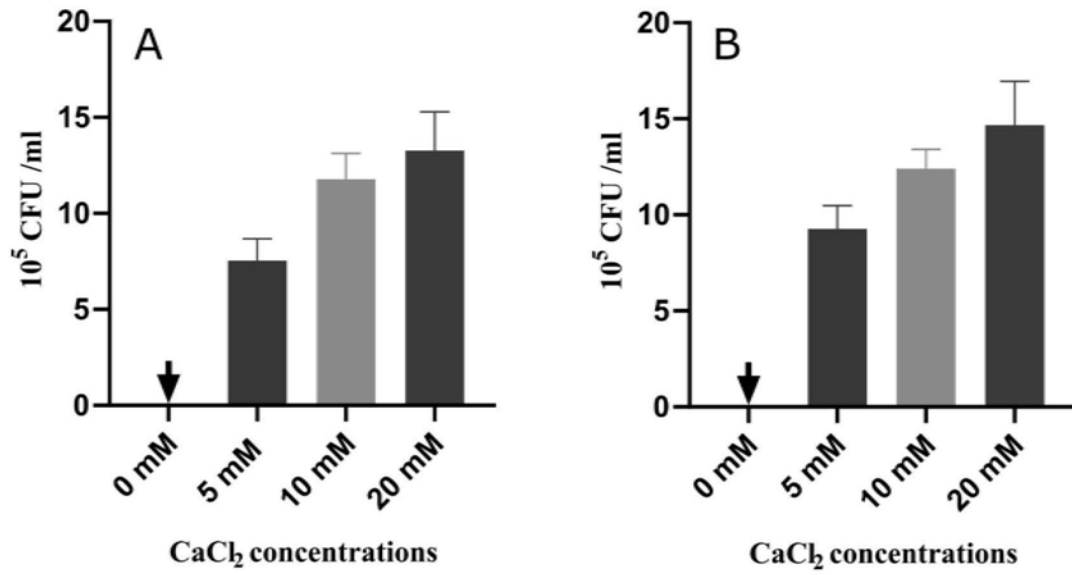


图9