基于计算机虚拟技术研究牦牛乳硬质干酪苦味肽的抑菌活性差异

杨保军[1,2]，梁 琪[*1,2]，宋雪梅[1,2]

（1. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院，甘肃 兰州 730070；2. 甘肃省功能乳品工程实验室，甘肃 兰州 730070）

摘要：为研究牦牛乳硬质干酪中苦味肽的抑菌活性差异及其与不同微生物菌体蛋白相互作用的氨基酸和位置信息。运用生物信息学方法计算牦牛乳硬质干酪中4种苦味肽RPKHPIK（RK7）、TPVVVPPFL（TL9）、VYPFPGPIPN（VN10）和SLVYPFPGPIPN（SN12）的分子特性，利用分子对接工具从分子层面研究肽的抑菌活性、研究肽段和不同菌体蛋白（大肠杆菌5BNS、金黄色葡萄球菌4ALM、沙门氏菌6CH3）之间相互作用的分子机制，通过BIOPEP数据库比对表征肽段抑菌活性。研究结果表明：RK7所带净电荷为3.1，疏水性氨基酸比例为42.86%；TL9所带净电荷为0，疏水性氨基酸比例为88.89%；VN10和SN12的疏水力矩分别为0.189和0.372，疏水性氨基酸比例为70.00%和66.67%。RK7和TL9均能和5BNS、4ALM、6CH3形成配体-受体复合物构象，VN10和SN12仅能和4ALM、6CH3形成配体-受体复合物构象；将RK7、TL9、VN10和SN12与抗菌肽数据库比对后发现RK7为抑菌活性已知的肽段，最高相似度为100%，TL9、VN10和SN12为潜在的具有抑菌活性的新型抗菌肽。结合肽段分子特性分析、分子对接和数据库比对预测4种苦味肽的抑菌活性，大肠杆菌抑制活性：RK7 > TL9，金黄色葡萄球菌抑制活性：RK7 > VN10 > TL9 > SN12，沙门氏菌抑制活性：RK7 > TL9 > VN10 > SN12。该研究为分子层面研究牦牛乳硬质干酪苦味肽结构特征及其抑菌活性提供了理论参考。

关键词：牦牛乳硬质干酪；苦味肽；抑菌活性；分子对接

中图分类号：TS 252.1　**文章编号：**1673-1689(2021)12-0075-13　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.12.010

Study on Difference of Antibacterial Activity of Bitter Peptide from Yak Milk Hard Cheese Based on Computer Virtual Technology

YANG Baojun[1,2]，*LIANG Qi*[*1,2]，*SONG Xuemei*[1,2]

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
2. Functional Dairy Product Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The difference in antibacterial activity of bitter peptides in yak milk hard cheese and the amino acid and position information of their interaction with different bacterial proteins were studied. The bioinformatic methods were used to calculate the molecular characteristics of four bitter

收稿日期：2021-01-22

基金项目：国家自然科学基金项目(31260383，31660468)。

*通信作者：梁 琪(1969—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品品质及食品科学方面研究。E-mail：Liangqi@gsau.edu.cn

peptides including RPKHPIK (RK7), TPVVVPPFL (TL9), VYPFPGPIPN (VN10) and SLVYPFPGPIPN (SN12) in yak milk hard cheese. The molecular docking tool was used to study the antibacterial activity of peptides and the molecular mechanism of the interaction between peptides and different bacterial proteins (*E. coli* 5BNS, *Staphylococcus aureus* 4ALM, *Salmonella* 6CH3) at the molecular level. BIOPEP database comparison was used to characterize the antibacterial activity of peptides. The results showed that the net charge of RK7 was 3.1, and the proportion of hydrophobic amino acids was 42.86%. The net charge of TL9 was 0, and the proportion of hydrophobic amino acids was 88.89%. The hydrophobic moments of VN10 and SN12 were 0.189 and 0.372, respectively, and the proportion of hydrophobic amino acids was 70.00% and 66.67%, respectively. Both RK7 and TL9 could form ligand-receptor complex conformations with 5BNS, 4ALM and 6CH3, while VN10 and SN12 could only form ligand-receptor complex conformations with 4ALM and 6CH3. After comparing RK7, TL9, VN10 and SN12 with the antibacterial peptide database, it was found that RK7 was a peptide with known antibacterial activity with the highest similarity of 100%, and TL9, VN10 and SN12 were potential new antibacterial peptides with antibacterial activity. The antibacterial activity of four bitter peptides was predicted through analysis of peptide molecular characteristics, molecular docking and database comparison. The inhibitory activity of *E. coli* was RK7 > TL9, while RK7 > VN10 > TL9 > SN12 for that of *Staphylococcus aureus* and RK7 > TL9 > VN10 > SN12 for that of *Salmonella* inhibitory activity. This study could provide a theoretical reference for studying the structural characteristics and antibacterial activity of bitter peptides from yak milk hard cheese at the molecular level.

Keywords: yak milk hard cheese, bitter peptides, antibacterial activity, molecular docking

抗菌肽主要来自乳源蛋白水解物[1-2],已证明乳铁蛋白和酪蛋白片段具有抑菌活性。1930 年 Jones 等首次从牛乳中发现抑制链球菌的抗菌性物质,命名为乳铁蛋白[3]。1974 年,Hill 等用凝乳酶水解牛乳 α_{s1}-酪蛋白,得到第一个对应于 α_{s1}-酪蛋白 1~23 位残基的抗菌肽(isracidine)[4]。2005 年 Mccann 等用胃蛋白酶酶解牛乳酪蛋白,得到对应于 α_{s1}-酪蛋白 99~109 位残基的新型抗菌肽(Cp_1)和对应于 α_{s2}-酪蛋白 183~207 位残基的抗菌肽(Cp_2)[5]。大多数抗菌肽在自然 pH 下带正电荷,正电荷数目的增加不仅可以提高抗菌肽与细菌细胞膜的结合能力,还能有效降低抗菌肽的杀菌浓度[6]。Sedaghati 等研究发现肽的疏水性对抑菌活性有影响,抗菌肽的 N 末端富含亲水性氨基酸残基,如赖氨酸、精氨酸等,C 末端富含疏水性氨基酸残基,如丙氨酸、甘氨酸,且通常被酰胺化[7]。此外,抗菌肽结构的稳定性受肽链长度的影响,从而抑菌活性也受到肽链长度的影响。Phambu 等通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)、扫描电子显微镜(SEM)、热重分析(TGA)及示差扫描量热法(DSC)研究表明理想的肽链长度(肽段含有 6 个氨基酸)可以增加分子内氢键作用,从而保持肽链的稳定性,进而与阴离子的脂质更好地结合,发挥更强的抑菌作用[8]。Théolier 等研究了加拿大 5 种市售干酪(Mozzarella,Gouda,Swiss,old Cheddar,medium Cheddar)脱盐纯化的水溶性提取物后发现,只有 Mozzarella 和 Gouda 干酪对李斯特菌 *ivanovii* 和大肠杆菌 MC4100 有明显抑制作用[9]。项目组前期研究牦牛乳硬质干酪水溶性肽粗提物的抑菌活性发现,其对大肠杆菌的最大抑菌圈直径为 15.91 mm,对金黄色葡萄球菌的最大抑菌圈直径为 16.50 mm,对沙门氏菌的最大抑菌圈直径为 16.03 mm。Fontenele 等研究了 Coalho 干酪酪蛋白衍生肽的生物活性后发现,β-酪蛋白肽(193~209 位)具有免疫调节、抑菌和降压活性,α_{s1}-酪蛋白肽(1~23 位)是一种具有免疫调节活性和抑菌活性的肽片段,这些结果被确定为巴西干酪的权威性标志[10]。当然牦牛乳硬质干酪中的肽粗提物也具有类似的抑菌、抗氧化和降压活性等。Fialho 等结合 MALDI-TOF/TOF、

MASCOT Daemon 与 UniProt 数据库对 3 种市售 Minas 干酪中提取的可溶性肽进行测序和鉴定,发现起源于 α_{S1}-酪蛋白的肽序列 PKHPIKHQ、RPKHPIKHQG、RPKHPIKHQGLPQ 和 RPKHPIKHQGLPQE 是属于 Isracidine 的片段,另外发现了两种 β-酪蛋白衍生的新抗菌肽序列 HQPHQPLPPT 和 MHQPHQPLPPT[11]。宋雪梅等经葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)色谱和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)从牦牛乳硬质干酪中鉴定出 14 种苦味肽,但肽与不同菌体蛋白之间相互作用的抑菌机理尚不清楚[12]。

基于结构的药物研究和设计主要采用的是分子对接技术。分子对接就是把配体分子放在受体活性位点的位置,然后按照几何互补、能量互补和化学环境互补的原则实时评价配体与受体相互作用的好坏,并找到两个分子间的最佳结合模式。目前对牦牛乳干酪中蛋白质降解肽抑菌活性的研究仍局限于其粗提物,关于净电荷、疏水性和疏水力矩等因素对肽段抑菌活性的影响鲜有报道。因此,运用相关生物信息学软件计算牦牛乳硬质干酪中 4 种苦味肽(RPKHPIK、TPVVVPPFL、VYPFPGPIPN 和 SLVYPFPGPIPN)的分子特性,运用分子对接技术从分子水平研究苦味肽抑菌活性、研究配体(苦味肽)和受体(不同菌体蛋白)间相互作用的分子机制,通过 BIOPEP 数据库比对表征肽段抑菌活性。为理论水平分析和分子水平解释干酪苦味肽的抑菌活性提供了有力支撑,为完善 BIOPEP 的抗菌肽数据库奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验工具和材料

实验工具:ChemBioDraw14.0.0.117(化学结构绘图软件),Discovery Studio Client v16.1.0 (DS)(蛋白质结构分析软件);实验材料:以项目组前期从牦牛乳硬质干酪中鉴定出的 4 种苦味肽为研究对象,4 种苦味肽的基本信息见表 1 (表中 Q 为氨基酸自由能改变量与肽链中氨基酸残基摩尔数的比值)。

表 1 牦牛乳硬质干酪中苦味肽氨基酸序列及其 Q 值

Table 1 Amino acid sequence and Q value of bitter peptide in yak milk hard cheese

肽段序列	相对分子质量	肽链长度/个	蛋白质来源	Q/(J/mol)
RPKHPIK(RK7)	875.09	7	α_{S1}-CN	7 415.18
TPVVVPPFL(TL9)	969.20	9	β-CN	7 908.78
VYPFPGPIPN(VN10)	1 100.28	10	β-CN	8 227.45
SLVYPFPGPIPN(SN12)	1 300.52	12	β-CN	7 588.94

注:A-丙氨酸(Ala)、D-天冬氨酸(Asp)、E-谷氨酸(Glu)、F-苯丙氨酸(Phe)、G-甘氨酸(Gly)、H-组氨酸(His)、I-异亮氨酸(Ile)、K-赖氨酸(Lys)、L-亮氨酸(Leu)、M-甲硫氨酸(Met)、N-天冬酰胺(Asn)、P-脯氨酸(Pro)、Q-谷氨酰胺(Gln)、R-精氨酸(Arg)、S-丝氨酸(Ser)、T-苏氨酸(Thr)、V-缬氨酸(Val)、W-色氨酸(Trp)、Y-酪氨酸(Tyr);疏水值越大,肽段具有的苦味越强。

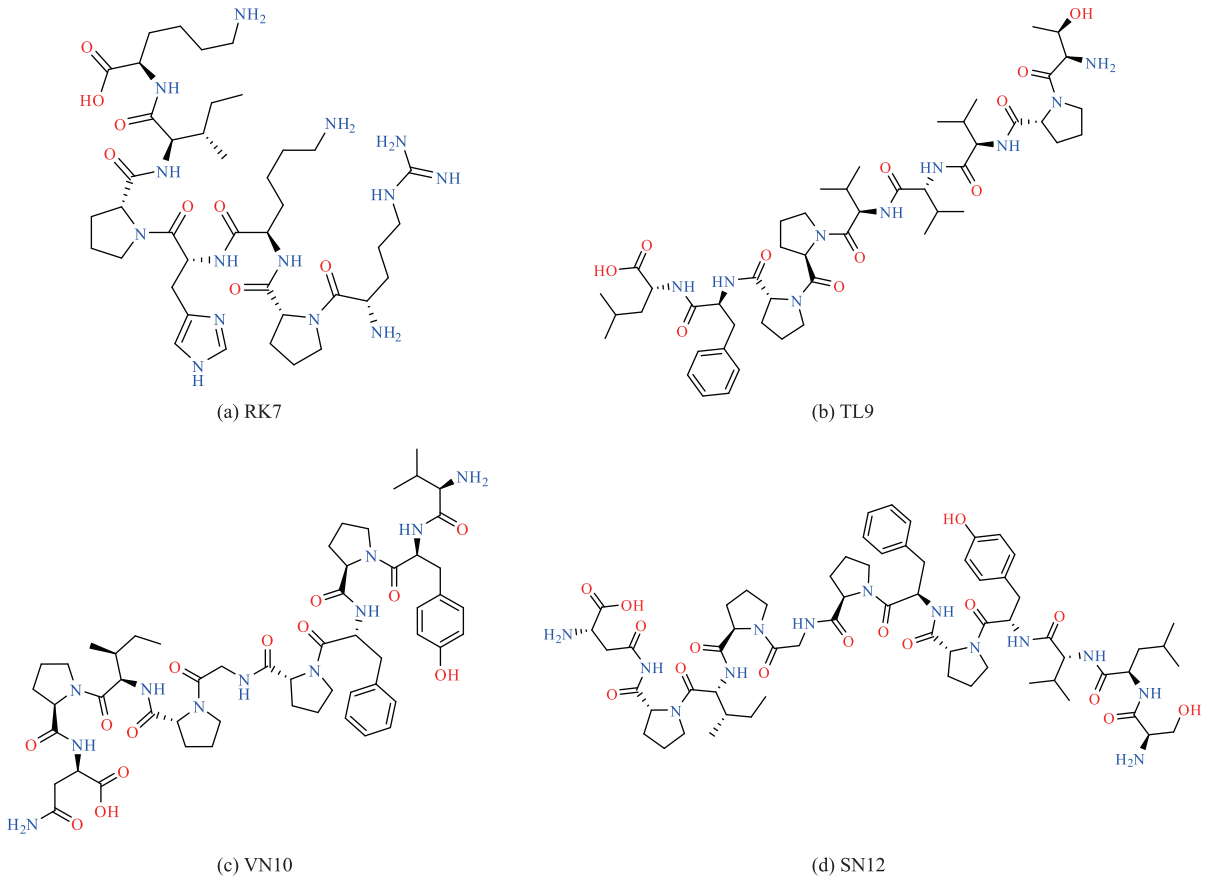
1.2 实验方法

1.2.1 苦味肽分子特性计算 用 Peptide Property Calculator 软件计算 4 种苦味肽的理论相对分子质量和净电荷[13];用 HeliQuest 软件计算 4 种苦味肽的疏水性指数和疏水力矩[14];用 PEPTIDE 2.0 软件计算 4 种苦味肽的疏水性氨基酸比例[13];用 PEPTIDE 2.0 软件预测肽的二级结构[15]。

1.2.2 配体结构优化 采用 ChemBioDraw 软件绘制苦味肽 RK7、TL9、VN10 和 SN12 的结构式,见图 1。然后将其复制到 DS 软件中,在 Small molecules 模块、CHARMM 力场下对其结构进行能量最小化处理,所有结构利用 DS 软件中的 Prepare Ligands 程序产生多构象,以便后续的分子对接,其他参数均为默认。经过处理后 RK7、TL9、VN10 和 SN12 产生多个配体分子,RK7 的 1 280 个配体分子包含 1 个互变异构体和 256 个立体异构体,TL9 和 VN10 的 2 个配体分子各包含 1 个互变异构体和 1 个立体异构体,SN12 的 10 个配体分子包含 3 个互变异构体和 1 个立体异构体。

1.2.3 准备受体蛋白 从 Protein Data Bank(PDB)数据库 (www.rcsb.org) 中下载大肠杆菌 (PDB ID:5BNS,分辨率为 2.2 Å)、金黄色葡萄球菌(PDB ID:4ALM, 分辨率为 2.45 Å) 和沙门氏菌 (PDB ID:6CH3,分辨率为 2.68 Å)蛋白晶体的 X 射线衍射三维结构,并用 DS 软件处理蛋白质,去除所有的水分子,去除蛋白质多构象,补充完整的氨基酸残基,为蛋白质加氢等(1Å=0.1 nm)。

1.2.4 分子对接 基于结构的药物设计工具



(a) RK7　(b) TL9　(c) VN10　(d) SN12

图 1　RK7、TL9、VN10 和 SN12 的分子结构

Fig. 1　Chemical structure of RK7, TL9, VN10 and SN12

LibDock 适用于对大规模数据库进行快速精确地虚拟筛选[16],因此,选择 DS 软件中的 LibDock 程序进行分子对接研究。对接前用 DS 软件中的 Define 和 Edit Binding Site 工具寻找菌体蛋白的可能结合部位,对接时将每个分子生成的对接构象数目设置为 10,其他参数均为系统默认值,对接后根据对接得分和结合能,确定苦味肽在菌体蛋白活性部位的最佳对接位姿;DS 软件还用于识别肽与菌体蛋白结合位点上残基之间的氢键、盐桥和范德华力等。

1.2.5　肽数据库比对　根据文献[17]对 BIOPEP 数据库的描述,结合分子对接情况,将牦牛乳硬质干酪中 4 种苦味肽与 BIOPEP 数据库中的抗菌肽序列进行比对,根据苦味肽段中具有抑菌活性的肽序列来表征和预测苦味肽的抑菌活性。

2　结果与分析

2.1　苦味肽分子特性分析

有关研究表明,决定抗菌肽抑菌活性的因素包括肽的疏水性强弱、含正电荷数、疏水力矩和二级结构等[14],另外,具有 α-螺旋构型的抗菌肽有较高的抑菌活性[15]。4 种苦味肽分子特性的计算结果表明（见表 2),RK7 含有 3 个碱性氨基酸和 3 个疏水性氨基酸,所带净电荷为 3.1,疏水性氨基酸比例为 42.86%,是 4 种苦味肽中疏水性氨基酸含量最低的肽段;TL9 含有 8 个疏水性氨基酸,疏水性氨基酸比例为 88.89%,是 4 种苦味肽中疏水性氨基酸含量最高的肽段;VN10 和 SN12 分别含有 7 个和 8 个疏水性氨基酸,疏水性氨基酸比例为 70.00%和 66.67%,疏水力矩分别为 0.189 和 0.372;二级结构预测发现这 4 种苦味肽均以无规则卷曲形式存在。所以可排除 RK7、TL9、VN10 和 SN12 二级结构对其抑菌活性的影响,即这 4 种苦味肽的抑菌活性很大程度上可能取决于其疏水性、正电荷数和疏水力矩。将通过蛋白质结构分析软件和分子对接工具对 RK7、TL9、VN10 和 SN12 的抑菌活性进行研究。

表 2　苦味肽的理化特性

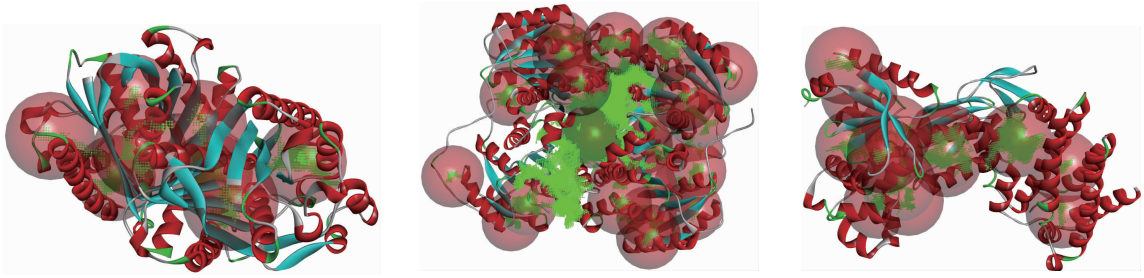
Table 2　Physicochemical properties of the bitter peptides

肽段序列	理论相对分子质量	疏水性指数	疏水力矩	净电荷	疏水性氨基酸比例/%	二级结构			
						α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲/%
RK7	875.07	—	—	3.1	42.86	0	0	0	100
TL9	968.19	—	—	0	88.89	0	0	0	100
VN10	1 100.26	0.805	0.189	0	70.00	0	0	0	100
SN12	1 300.50	0.809	0.372	0	66.67	0	0	0	100

注：http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py 提供的软件仅适用于含有 10 个或 10 个以上氨基酸残基的肽段。

2.2　寻找受体结合区

利用 DS 软件中的 Define 和 Edit Binding Site 工具寻找受体中的空腔，以此来确定受体中可能的结合部位。图 2(a)为 5BNS 的三维构象，经过处理后系统视图中自动添加 9 个结合位点(Site1~9)，即找到了 9 个可能的结合区域；图 2(b)为 4ALM 的三维构象，经过处理后系统视图中自动添加 31 个结合位点（Site1~31），即找到了 31 个可能的结合区域；图 2(c)为 6CH3 的三维结构，经过处理后系统视图中自动添加 15 个结合位点(Site1~15)，即找到了 15 个可能的结合区域。



(a) 大肠杆菌（5BNS）结合区域　(b) 金黄色葡萄球菌（4ALM）结合区域　(c) 沙门氏菌（6CH3）结合区域

图 2　从受体中寻找可能结合区域

Fig. 2　Searching for possible binding regions from receptor

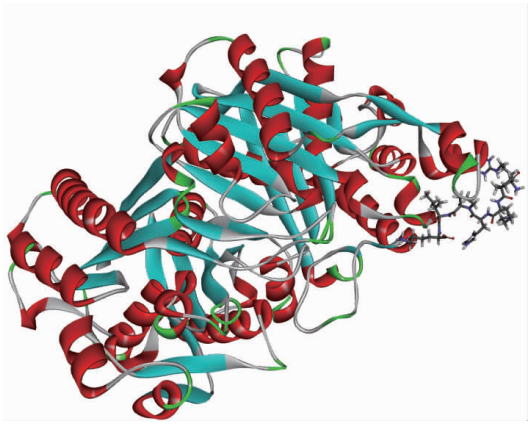
2.3　分子对接

2.3.1　大肠杆菌(5BNS)与配体的作用机制　通过 DS 软件中的 LibDock 对接程序研究了 RK7、TL9、VN10 和 SN12 对 5BNS 的抑制机制，对接后 RK7、TL9 与 5BNS 成功形成配体-受体复合物构象，最佳对接构象见图 3 和图 4。

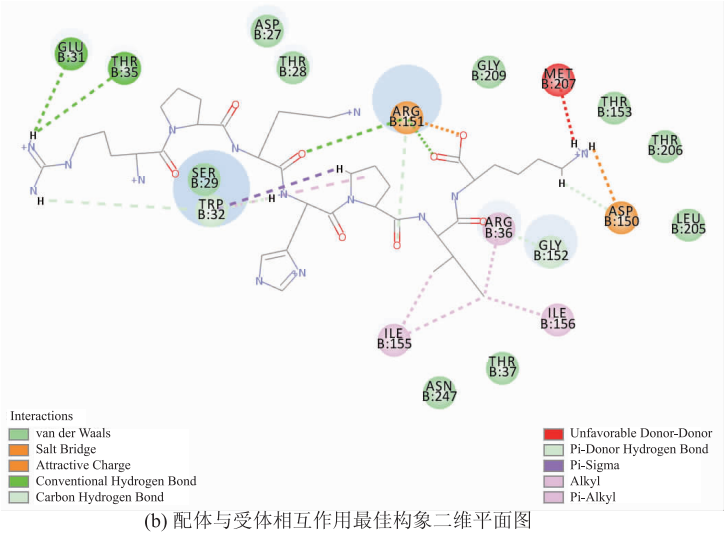
RK7 与 5BNS 对接后得到 26 个对接构象，这些构象均位于 Site7 区域(X:6.28 Y:41.91 Z:28.88 R:9.00 Å)，最佳对接构象的对接得分为 163.023，结合能为 5 622.91 kJ/mol。图 3 为 RK7 与 5BNS 对接形成的最佳构象图，结果显示 RK7 与 5BNS 的氨基酸残基 Glu31(4.34 Å)、Thr35(3.90 Å)和 Arg151(4.10 Å、6.48 Å)之间形成了 4 个不同距离的氢键，其中 RK7 和氨基酸残基 Arg151 之间含有 2 个氢键，与 Thr35 之间形成的氢键最短，结合最紧密；RK7 与氨基酸残基 Trp32（3.00 Å、3.89 Å）、Asp150（4.69 Å）和 Arg151(3.32 Å)形成 4 个距离不同的碳氢键，与氨基酸残基 Asp150(4.68 Å)和 Arg151(3.41 Å)形成盐桥或电荷相互作用。

TL9 与 5BNS 对接后得到 2 个对接构象，这 2 个构象均位于 Site7 区域（X:6.28 Y:41.91 Z:28.88 R:9.00 Å)，最佳对接构象的对接得分为 148.819，结合能为 8 391.90 kJ/mol。图 4 为 TL9 与 5BNS 对接形成的最佳构象图，结果表明，TL9 与 5BNS 的氨基酸残基 Asp27(4.31 Å)、Trp32(5.35 Å)、Arg36(4.05 Å)、Arg151(6.12 Å)和 Asn210(5.06 Å)之间形成了 5 个不同距离的氢键，与 Arg36 之间形成的氢键最短，结合最紧密；TL9 与氨基酸残基 Asp27(4.45 Å、5.02 Å)、Thr28(4.18 Å)和 Gly152(2.96 Å)形成 4 个距离不同的碳氢键，与氨基酸残基 Arg36(4.12 Å)形成电荷相互作用。

2.3.2　金黄色葡萄球菌(4ALM)与配体的作用机制　RK7、TL9、VN10 和 SN12 与 4ALM 的对接构象见图 5~8。RK7 与 4ALM 对接后得到 232 个对接构象，其



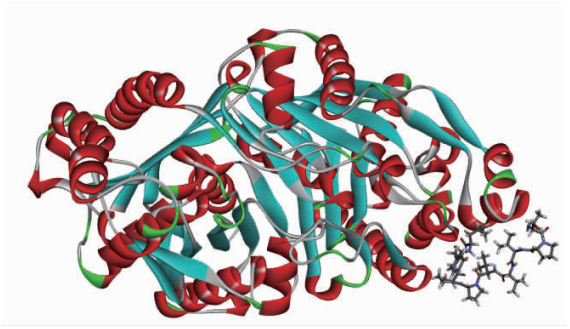
(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图



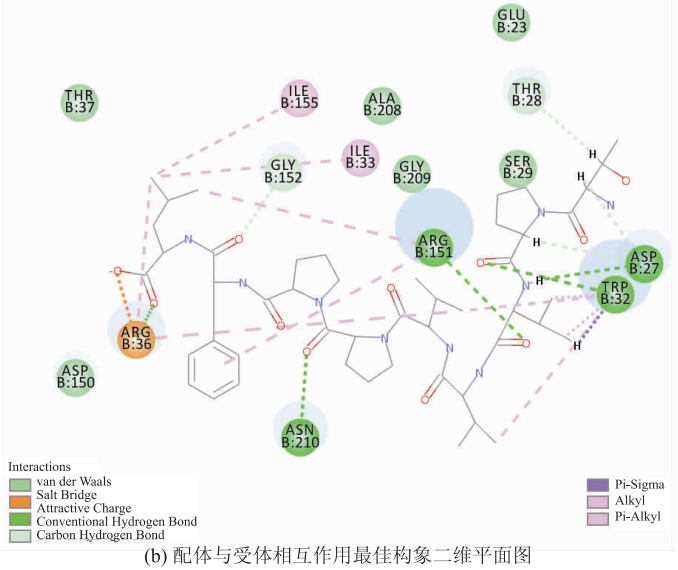
(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 3　RK7 与 5BNS 的结合位点及相互作用

Fig. 3　Binding site and interaction between RK7 and 5BNS



(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图

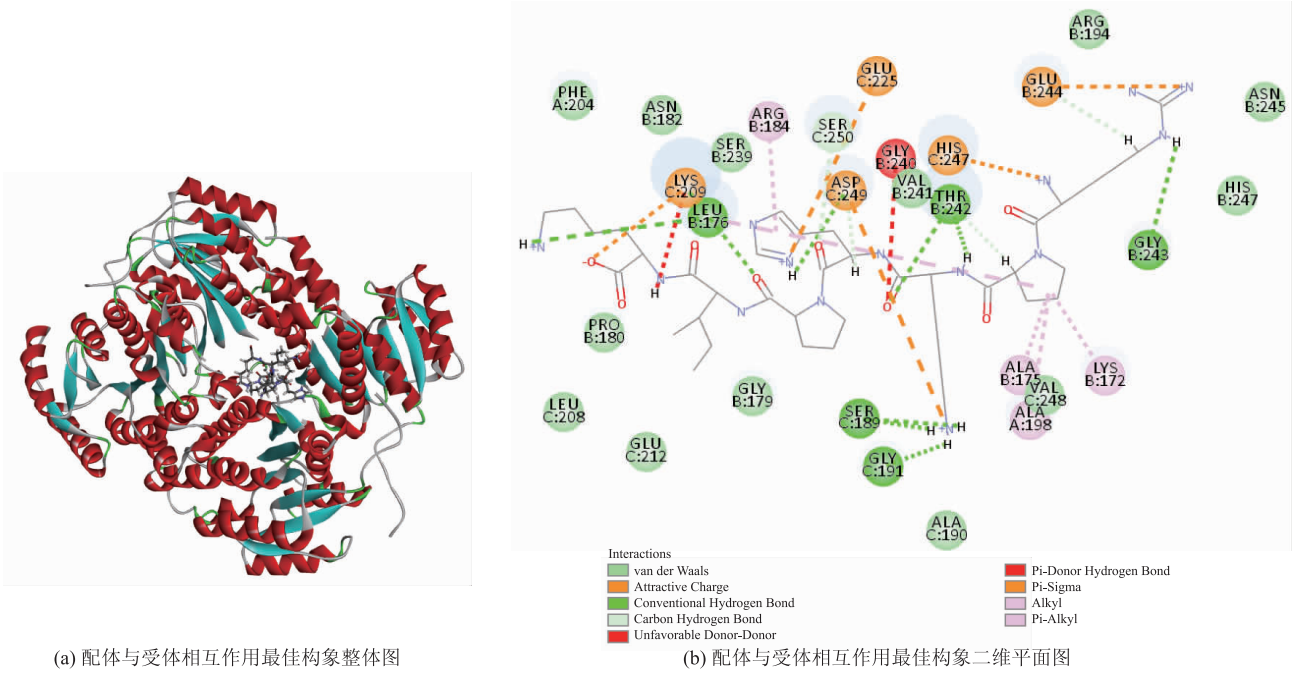


(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 4　TL9 与 5BNS 的结合位点及相互作用

Fig. 4　Binding site and interaction between TL9 and 5BNS

中 Site1 区域包含 50 个对接构象,Site3 区域包含 8 个对接构象,Site6 区域包含 39 个对接构象,Site8 区域包含 50 个对接构象,Site10 区域包含 16 个对接构象,Site15 区域包含 50 个对接构象,Site16 区域包含 16 个对接构象,Site19 区域包含 2 个对接构象,Site24 区域包含 1 个对接构象,最佳对接构象位于 Site8 区域（X:−32.27 Y:13.97 Z:45.97 R:9.00 Å),对接得分为 192.573,结合能为 2 729.67 kJ/mol。图 5 为 RK7 与 4ALM 对接形成的最佳构象图,结果表明,RK7 与 4ALM 的氨基酸残基 Leu176 (4.44 Å)、Ser189 (3.62 Å、4.59 Å)、Gly191 (2.83 Å)、Lys209 (6.03 Å)、Thr242 (2.81 Å、3.90 Å)、Gly243 (4.81 Å) 和Asp249 (3.73 Å) 之间形成了 9 个距离不同的氢键，其中 Ser189 和 Thr242 分别参与了 2 个氢键的形成，在 RK7 与 4ALM 的相互作用中贡献较大；RK7 与氨基酸残基 Thr242 (4.24 Å)、Glu244 (4.19 Å)、Asp249 (3.30 Å) 和 Ser250 (4.27 Å) 形成 4 个距离不同的碳氢键，与氨基酸残基 Lys209 (5.05 Å)、Glu225 (7.54 Å)、Glu244 (5.28 Å)、His247 (4.52 Å) 和 Asp249 (4.35 Å) 形成电荷或 π−Cation 相互作用。

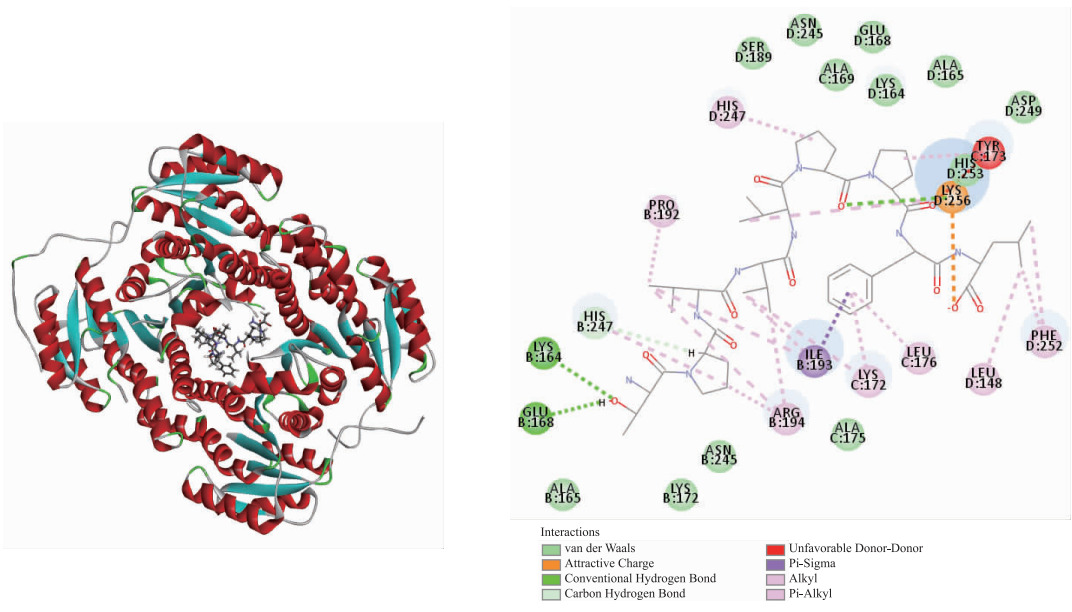


(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 5　RK7 与 4ALM 的结合位点及相互作用

Fig. 5　Binding site and interaction between RK7 and 4ALM

TL9 与 4ALM 对接后得到 47 个对接构象,其中 Site1 区域包含 20 个对接构象,Site6 区域包含 5 个对接构象,Site8 区域包含 12 个对接构象,Site15 区域包含 10 个对接构象,最佳对接构象位于 Site1 区域(X:−42.00 Y:−2.21 Z:32.23 R:9.00 Å),对接得分为 158.314,结合能为 3127.41 kJ/mol。图 6 为 TL9 与 4ALM 对接形成的最佳构象图,结果显示,TL9 与 4ALM 的氨基酸残基 Lys164 (5.05 Å)、Glu168(5.04 Å)和 Lys256(5.57 Å)之间形成了 3 个距离不同的氢键;TL9 与氨基酸残基 His247(5.28 Å)形成 1 个碳氢键,与 Lys256(5.57 Å)形成电荷相互作用。

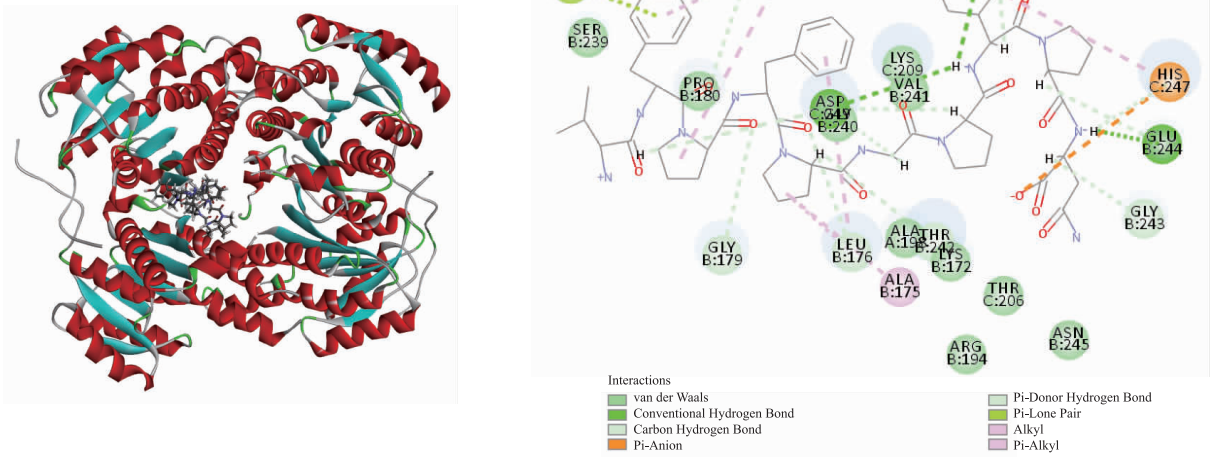


(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 6　TL9 与 4ALM 的结合位点及相互作用

Fig. 6　Binding site and interaction between TL9 and 4ALM

VN10 与 4ALM 对接后得到 21 个对接构象,其中 Site1 区域包含 20 个对接构象,Site8 区域包含 1 个对接构象，最佳构象位于 Site8 区域（X:−32.27 Y:13.97 Z:45.97 R:9.00 Å），对接得分为 179.923，结合能为 162 654.67 kJ/mol。图 7 为 VN10 与 4ALM 对接形成的最佳构象图，结果表明,VN10 与 4ALM 的氨基酸残基 Arg184（4.19 Å）、Gly191（4.50 Å）、Glu244(4.76 Å)和 Asp249(3.55 Å)之间形成了 4 个不同距离的氢键;VN10 与氨基酸残基 Leu176(3.92 Å)、Gly179 (3.36 Å)、Gly191 (4.23 Å)、Thr242 (2.90 Å)、Gly243 (3.96 Å)、Glu244 (5.09 Å)、His247 (2.78 Å)、Asp249 (4.06 Å、4.95 Å、5.34 Å)和 Ser250 (4.19 Å、4.25 Å) 形成碳氢键或 π−Donor Hydrogen 键,与 His247(4.73 Å)形成电荷相互作用。



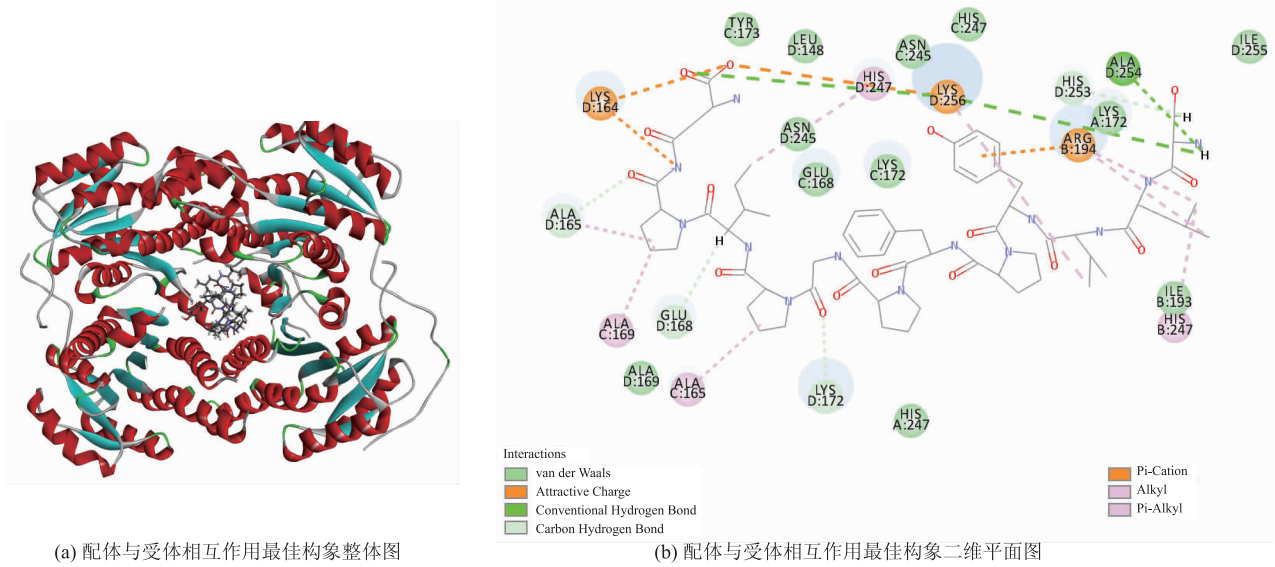
(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 7　VN10 与 4ALM 的结合位点及相互作用

Fig. 7　Binding site and interaction between VN10 and 4ALM

SN12 与 4ALM 对接后得到 22 个对接构象,其中 Site1 区域包含 10 个对接构象,Site8 区域包含 9 个对接构象,Site15 区域包含 1 个对接构象,Site16 区域包含 2 个对接构象，最佳构象位于 Site1 区域（X:−42.00 Y:−2.21 Z:32.23 R:9.00 Å），对接得分为31.892,结合能为 5 703.22 kJ/mol。图 8 为 SN12 与 4ALM 对接形成的最佳构象图，结果显示,SN12 与4ALM 的氨基酸残基 Ala254(4.26 Å)和 Lys256 (3.89 Å、6.32 Å)之间形成了 3 个距离不同的氢键;SN12 与氨基酸残基 Ala165 (3.45 Å)、Glu168(3.78 Å)和 His253(4.52 Å)形成 3 个距离不同的碳氢键,与Lys164(5.51 Å、6.45 Å)、Arg194(5.89 Å)和Lys256 (8.12 Å)形成电荷相互作用。

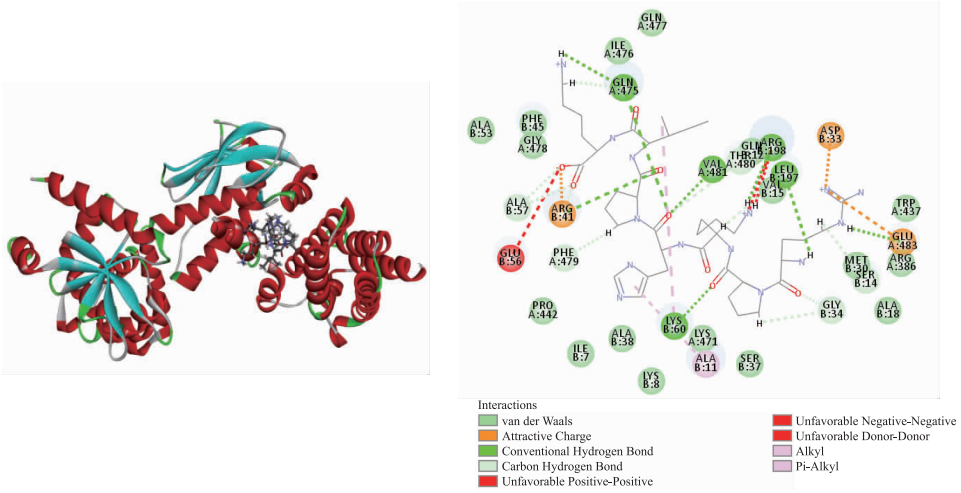
2.3.3　沙门氏菌(6CH3)与配体的作用机制　RK7、TL9、VN10 和 SN12 与 6CH3 的对接构象见图 9~12。RK7 与 6CH3 对接后得到 58 个对接构象,其中 Site1 区域包含 50 个对接构象,Site2 区域包含 1 个对接构象,Site5 区域包含 5 个对接构象,Site9 区域包含 2 个对接构象，最佳构象位于 Site1 区域(X: 4.21 Y:39.79 Z:4.74 R:9.00 Å)，对接得分为 186.054,结合能为 38 274.18 kJ/mol。图 9 为 RK7 和 6CH3 对接形成的最佳构象图，结果显示,RK7 与 6CH3 的氨基酸残基 Arg41(5.83 Å)、Lys60(6.15 Å)、Leu197(3.47 Å)、Arg198 (3.58 Å)、Gln475 (3.85 Å、5.05 Å)、Val481(4.53 Å)和 Glu483(4.31 Å)之间形成了8 个距离不同的氢键,其中 RK7 和氨基酸残基 Gln475 之间含有 2 个氢键，与 Leu197 之间形成的氢键最短，结合最紧密;RK7 与氨基酸残基 Met30 (4.39 Å)、Gly34 (2.72 Å、3.38 Å)、Arg41 (3.44 Å)、Ala57 (3.41 Å、3.44 Å)、Leu197 (5.80 Å)、Gln475 (6.56 Å)、Phe479(5.61 Å)和 Thr480(4.23 Å)之间形成了 10 个距离不同的碳氢键,与 Asp33(6.10 Å)、



(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 8　SN12 与 4ALM 的结合位点及相互作用

Fig. 8　Binding site and interaction between SN12 and 4ALM



(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 9　RK7 与 6CH3 的结合位点及相互作用

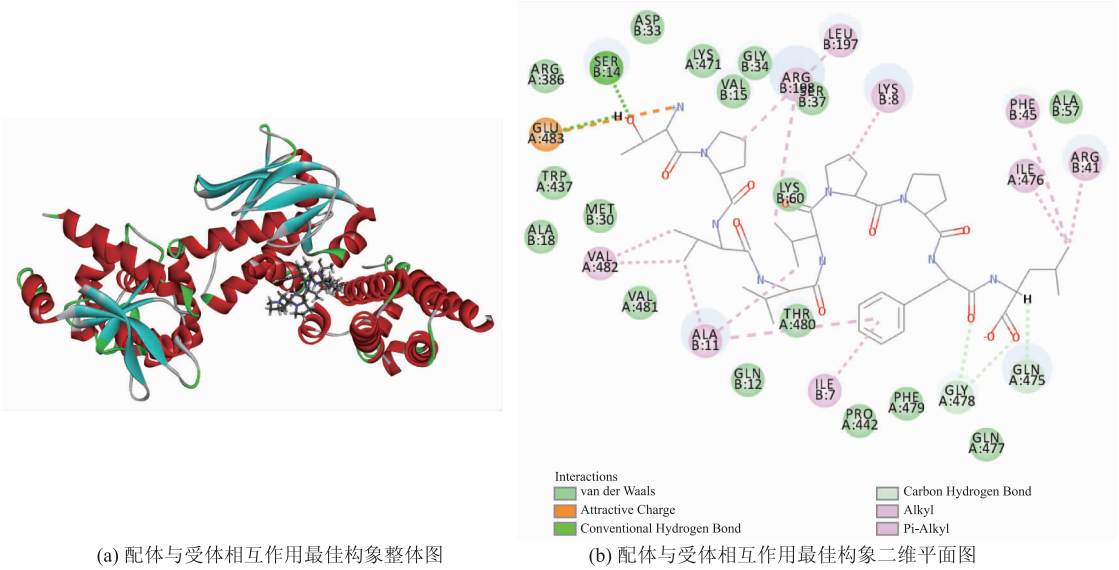
Fig. 9　Binding site and interaction between RK7 and 6CH3

Arg41(5.30 Å)和Glu483(6.36 Å)形成电荷相互作用。

TL9 与 6CH3 对接后得到 6 个对接构象，这些构象均位于 Site1 区域（X:4.21 Y:39.79 Z:4.74 R:9.00 Å),最佳构象的对接得分为 144.172,结合能为 4 198.23 kJ/mol。图 10 为 TL9 与 6CH3 对接形成的最佳构象图,结果表明,TL9 与 6CH3 的氨基酸残基 Ser14(4.18 Å)和 Glu483(4.68 Å)之间形成了 2 个距离不同的氢键;TL9 与氨基酸残基 Gln475(5.14 Å)和 Gly478(3.50 Å、3.58 Å)形成了 3 个距离不同的碳氢键,与 Glu483(7.27 Å)形成电荷相互作用。

VN10 与 6CH3 对接后得到 1 个对接构象,该构象位于 Site1 区域（X:4.21 Y:39.79 Z:4.74 R:9.00 Å),对接得分为 109.897,结合能为 61 702.13 kJ/mol。图 11 为 VN10 与 6CH3 对接形成的构象图,结果表明,VN10 与 6CH3 的氨基酸残基 Ser14(4.24 Å、4.39 Å)、Asp33(4.53 Å)、Arg198(3.92 Å)和 Lys471(5.60 Å）之间形成了 5 个距离不同的氢键;VN10 与氨基酸残基 Ala11(2.75 Å)、Met30(3.33 Å)、Arg41(6.44 Å)、Glu56(5.57 Å)和 Lys471(5.60 Å)形成了 5 个距离不同的碳氢键,与 Glu56(6.60 Å)形成电荷相互作用。

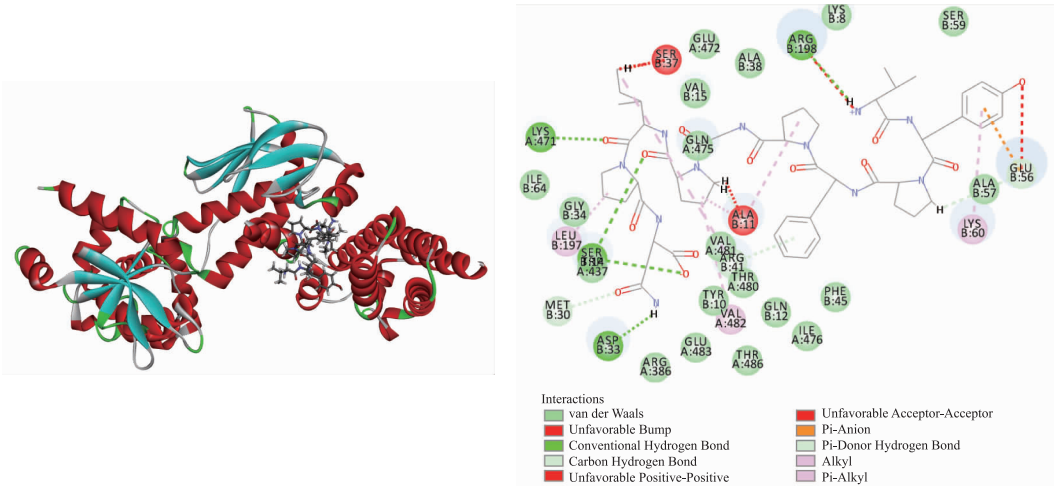
SN12 与 6CH3 对接后得到 4 个对接构象,这 4



(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 10　TL9 与 6CH3 的结合位点及相互作用

Fig. 10　Binding site and interaction between TL9 and 6CH3



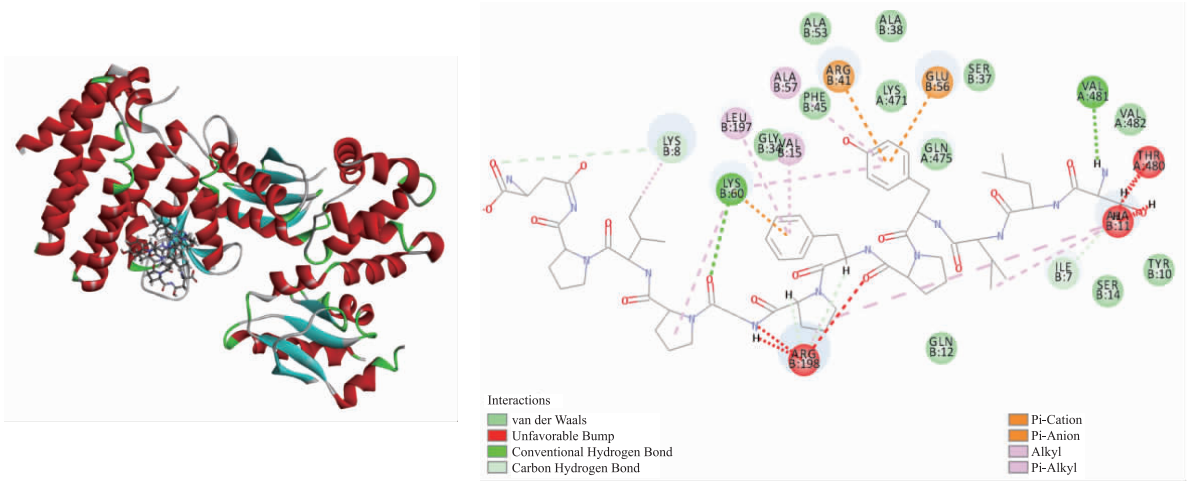
(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 11　VN10 与 6CH3 的结合位点及相互作用

Fig. 11　Binding site and interaction between VN10 and 6CH3

个构象全部位于 Site1 区域(X:4.21 Y:39.79 Z:4.74 R:9.00 Å),最佳构象的对接得分为−272.228,结合能为 252 021 549.25 kJ/mol。图 12 为 SN12 与 6CH3 对接形成的最佳构象图，结果表明,SN12 与 6CH3 的氨基酸残基 Lys60（4.93 Å）、Arg198（5.34 Å）和 Val481（4.90 Å）之间形成 3 个距离不同的氢键；SN12 与氨基酸残基 Lys8(3.70 Å)、Ala11(5.43 Å)和 Arg198(3.67 Å、5.87 Å)形成了 4 个距离不同的碳氢键，与 Arg41(5.82 Å)、Glu56(6.65 Å)和 Lys60(7.40 Å)形成电荷相互作用。

抗菌肽抑菌活性强弱与肽链中某些特殊氨基酸残基密切相关，如含有 Arg 和 Val 的抗菌肽,Arg 可以使阴离子膜上的磷脂形成环形孔[18],Val 可以促进 β-折叠片段的延伸[19],因此这类抗菌肽具有更强的静电膜吸附作用和较高的抑菌活性。Lee 等对人工合成抗菌肽 P1(KWKLFK KIPKFLHLAKKF)C 端和 N 端氨基酸逐一切除发现 Pro 对该肽的抑菌活性发挥着重要作用[20]。所有肽段当中均含有不同数量的 Arg、Val 或 Pro,这为肽段具有抑菌活性奠定了基础。



(a) 配体与受体相互作用最佳构象整体图　　(b) 配体与受体相互作用最佳构象二维平面图

图 12　SN12 与 6CH3 的结合位点及相互作用

Fig. 12　Binding site and interaction between SN12 and 6CH3

抗菌肽疏水性是影响其抑菌活性的重要因素之一[21]。在一定范围内,抗菌肽疏水性越大,抑菌活性越强,但疏水性过高会导致抗菌肽自身聚集至沉淀析出,降低抑菌活性[22]。Jiang 等研究表明,提高抗菌肽的疏水性,其抑菌活性得到提高,但其溶血活性也随之提高,且溶血活性提高幅度大于抑菌活性提高幅度,极大降低了抗菌肽的治疗指数[23]。溶血活性是抗菌肽的一个毒副作用,代表抗菌肽对血红细胞的破坏力度。肽链长度与抗菌肽抑菌活性之间存在二次函数关系,且较短的抗菌肽往往拥有更低的细胞毒性和溶血活性[24]。疏水力矩用于对多肽两亲性指标的定量描述[25],平均疏水力矩对抑菌活性的影响要大于疏水性对抑菌活性的影响[26]。Hawrani 等研究指出,增加抗菌肽的疏水力矩和疏水性使得抗菌肽的抑菌活性降低,溶血活性增加[27]。抗菌肽大部分为碱性阳性肽,可以与带负电荷的细菌细胞膜通过正负电荷之间的静电引力相结合,使细菌细胞膜破裂或形成孔洞,细胞内容物外泄,菌体不能维持正常生命活动所需的胞内渗透压而死亡[28-29]。

此外,抗菌肽与膜脂之间的氢键对抗菌肽维持活性结构至关重要[30],片层结构型抗菌肽主要通过肽与膜脂间的氢键或范德华力而不是残基间的氢键来发挥作用[31]。经测定发现 4 种苦味肽 RK7、TL9、VN10 和 SN12 的二级结构均以无规则卷曲形式存在,所以排除肽与脂膜间氢键对苦味肽抑菌活性的影响;氢键是分子间的较强作用力,对配体和受体形成稳定复合物构象发挥着重要作用。

2.4　苦味肽抑菌活性表征和预测

BIOPEP 数据库是目前最全面的生物活性肽数据库[18],截至 2021 年 1 月,BIOPEP 数据库记录了 4 132 种功能活性已知的肽段,其中 510 种肽段具有抑菌活性,将 RK7、TL9、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 中的抗菌肽数据库比对后发现 RK7(ID:8164)来源于 α_{S1}-酪蛋白(1~7 位),为抑菌活性已知的肽段,最高相似度为 100%,TL9、VN10 和 SN12 当中均不含 BIOPEP 数据库中抑菌活性已知的肽片段,但分子对接显示这 3 种肽仍能和 5BNS、4ALM 或 6CH3 结合,所以推测 TL9、VN10 和 SN12 为新型抗菌肽。综上所述,预测 4 种苦味肽的抑菌活性,大肠杆菌抑制活性:RK7 > TL9,金黄色葡萄球菌抑制活性:RK7 > VN10 > TL9 > SN12,沙门氏菌抑制活性:RK7 > TL9 > VN10 > SN12。

3　结　语

通过对牦牛乳硬质干酪中 4 种苦味肽 RK7、TL9、VN10 和 SN12 的分子特性进行计算和分析,对肽结构做能量最小化处理并将它们定义为配体,从 PDB 数据库中获取来自不同菌体(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌)蛋白质晶体的 X 射线衍射三维结构(5BNS、4ALM、6CH3)并将它们定义为受体,配体和受体经 DS 软件优化处理后运用分子对接工具对苦味肽抑菌活性及其作用机制进行研究,结果表明 RK7、TL9 均能和 5BNS、4ALM、6CH3 形

成配体-受体复合物构象,VN10 和 SN12 仅能和 4ALM、6CH3 形成配体-受体复合物构象。将 RK7、TL9、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 数据库中的抗菌肽比对后发现 RK7 为抑菌活性已知的完整肽段,TL9、VN10 和 SN12 当中虽不含已知抑菌活性的肽片段,但仍能和 5BNS、4ALM 或 6CH3 结合,所以推测 TL9、VN10 和 SN12 为新型抗菌肽。结合肽段分子特性分析、分子对接和数据库比对预测 4 种苦味肽的抑菌活性,大肠杆菌抑制活性:RK7 > TL9,金黄色葡萄球菌抑制活性:RK7 > VN10 > TL9 > SN12,沙门氏菌抑制活性:RK7 > TL9 > VN10 > SN12。下一步将通过体外实验对 4 种肽段单体的抑菌活性进行验证。分子对接等生物信息学方法有效揭示了牦牛乳硬质干酪中具有抑菌活性的苦味肽与不同微生物菌体蛋白间相互作用的分子机制,为抗菌肽的研究提供技术支持,此外,选取的 3 种肽 TL9、VN10 和 SN12 并不在 BIOPEP 的抗菌肽数据库中,因此有可能成为抗菌肽数据库的扩充片段。

参考文献:

[1] CLARE D A,CATIGNANI G L,SWAISGOOD H E. Biodefense properties of milk:the role of antimicrobial proteins and peptides[J]. **Current Pharmaceutical Design**,2003,9(16):1239-1255.

[2] WALTHER B,SCHMID A,SIEBER R,et al. Cheese in nutrition and health[J]. **Dairy Science & Technology**,2008,88(4-5):389-405.

[3] JONES F S,SIMMS H S. The bacterial growth inhibitor(lactenin) of milk:I. the preparation in concentrated form[J]. **Journal of Experimental Medicine**,1930,51(2):327-339.

[4] HILL R D,LAHAV E,GIVOL D. A rennin-sensitive bond in α_{S1}-casein and β-casein[J]. **Journal of Dairy Research**,1974,41(1):147-153.

[5] MCCANN K B,SHIELL B J,MICHALSKI W P,et al. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{S1}-casein[J]. **International Dairy Journal**,2005,16(4):316-323.

[6] DATHE M,WIEPRECHT T. Structural features of helical antimicrobial peptides:their potential to modulate activity on model membranes and biological cells[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,1999,1462(1/2):71-87.

[7] SEDAGHATI M,EZZATPANAH H,MASHHADI A B M B,et al. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of β-casein[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2016,68:217-225.

[8] PHAMBU N,ALMARWANI B,GARCIA A M,et al. Chain length effect on the structure and stability of antimicrobial peptides of the $(RW)_n$ series[J]. **Biophysical Chemistry**,2017,227:8-13.

[9] THÉOLIER J,HAMMAMI R,FLISS I,et al. Antibacterial and antifungal activity of water-soluble extracts from Mozzarella, Gouda,Swiss,and Cheddar commercial cheeses produced in Canada[J]. **Dairy Science and Technology**,2014,94(5):427-438.

[10] FONTENELE M A,BASTOS M D S R,DOSSANTOS K M O,et al. Peptide profile of Coalho cheese:a contribution for protected designation of origin(PDO)[J]. **Food Chemistry**,2017,219:382-390.

[11] FIALHO T L,CARRIJO L C,MAGALHÃES J M J,et al. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese[J]. **Food Research International**,2018,107:406-413.

[12] 宋雪梅,张炎,杨敏,等. 牦牛乳硬质干酪苦味肽的分离与特征鉴定[J]. 食品科学,2016,37(15):160-164.

[13] SOLEYMANZADEH N,MIRDAMADI S,MIRZAEI M,et al. Novel β-casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899:identification and molecular docking[J]. **International Dairy Journal**,2019,97:201-208.

[14] 付永岩,李盈盈,姜瞻梅,等. 牛乳铁蛋白衍生肽 FP-PF 的安全性及其抑菌机理[J]. 中国食品学报,2020,20(8):92-99.

[15] 李杰,杭柏林,秦爱建,等. 牛血红蛋白源抗菌肽 P3 及其类似肽的生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(1):59-64.

[16] 黄勇,陈晨,张志毅,等. Autodock Vina 与Discovery Studio 在虚拟筛选耐药蛋白抑制剂中的比较[J]. 生物信息学,2012,10(4):248-253.

[17] MINKIEWICZ P,IWANIAK A,DAREWICZ M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides:current opportunities [J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2019,20(23):1-23

[18] TANG M,HONG M. Structure and mechanism of β-hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy[J]. **Molecular BioSystems**,2009,5(4):317-322.

[19] TANG M，WARING A J，HONG M. Effects of arginine density on the membrane-bound structure of a cationic antimicrobial peptide from solid-state NMR[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**，2009，1788(2)：514-521.
[20] LEE D G，HAHM K S，SHIN S Y. Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide，P18，and its truncated peptides[J]. **Biotechnology Letters**，2004，26(4)：337-341.
[21] GRAU-CAMPISTANY A，STRANDBERG E，WADHWANI P，et al. Hydrophobic mismatch demonstrated for membranolytic peptides，and their use as molecular rulers to measure bilayer thickness in native cells[J]. **Scientific Reports**，2015，5(1)：1-9.
[22] 李志成，苏晋文，任娇，等. 山羊乳酪蛋白抗菌肽分离纯化及结构鉴定[J]. 中国食品学报，2014，14(7)：214-223.
[23] JIANG Z Q，KULLBERG B J，LEE H，et al. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of α-helical antimicrobial peptides[J]. **Chemical Biology & Drug Design**，2008，72(6)：483-495.
[24] DONG N，MA Q，SHAN A，et al. Strand length-dependent antimicrobial activity and membrane-active mechanism of arginine-and valine-rich β-hairpin-like antimicrobial peptides[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**，2012，56(6)：2994-3003.
[25] DATHE M，WIEPRECHT T，NIKOLENKO H，et al. Hydrophobicity，hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides[J]. **FEBS Letters**，1997，403(2)：208-212.
[26] PÉREZ-PAYÁ E，HOUGHTEN R A，BLONDELLE S E. The role of amphipathicity in the folding，self-association and biological activity of multiple subunit small proteins[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1995，270(3)：1048-1056.
[27] HAWRANI A，HOWE R A，WALSH T R，et al. Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides[J]. **Journal of Biological Chemistry**，2008，283(27)：18636-18645.
[28] HANCOCK R E. Cationic peptides：effectors in innate immunity and novel antimicrobials[J]. **Lancet Infectious Diseases**，2001，1(3)：156-164.
[29] CHAITHANYA E R，PHILIP R，SATHYAN N，et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a histone-derived antimicrobial peptide teleostin from the marine teleost fishes，*Tachysurus jella* and *Cynoglossus semifasciatus*[J]. **ISRN Molecular Biology**，2013，2013：1-7.
[30] BULET P，HETRU C，DIMARCQ J L，et al. Antimicrobial peptides in insects；structure and function[J]. **Developmental and Comparative Immunology**，1999，23(4/5)：329-344.
[31] 魏照征，田健，伍宁丰，等. 抗菌肽构效关系及其表达策略研究进展[J]. 生物技术通报，2011(2)：7-11.
[32] FU Y，YOUNG J F，LØKKE M M，et al. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory peptides based on *in silico* and *in vitro* protein digestions[J]. **Journal of Functional Foods**，2016，24：196-206.

科　技　信　息

研究者提出低降温速率冷冻制样消除蛋白质快速漂移

近期，*QRB Discovery* 在线发表了中国科学院生物物理研究所研究员章新政课题组题为“Low-cooling-rate freezing in biomolecular cryo-electron microscopy for recovery of initial frames”的研究论文。研究发现了在冷冻电镜成像过程中导致电子束诱导蛋白质样品快速漂移的新机制，并提出通过降低冷却速率制备无快速漂移的冷冻电镜样品的新方法。该方法可以有效恢复辐照损伤最少，含高分辨信号最多的成像数据质量，提升重构分辨率，实现辐照损伤敏感氨基酸的高分辨重构，高分辨信号的恢复也为冷冻电镜达到原子分辨率奠定了基础。

[信息来源]中国科学院生物物理研究所.研究者提出低降温速率冷冻制样消除蛋白质快速漂移[EB/OL]. (2021-11-15). https://www.cas.cn/syky/202110/t20211013_4808933.shtml