

杨鸿雁, 单紫轩, 赖亮, 等. 天然产物中抗微生物肽的高效筛选方法及研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 28–35. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030395

YANG Hongyan, SHAN Zixuan, LAI Liang, et al. A Review of Methods and Progress in Highly Efficient Screening of Antimicrobial Peptides from Natural Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 28–35. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030395

· 青年编委专栏—益生菌与抗菌肽 (客座主编: 孙志宏、付才力) ·

天然产物中抗微生物肽的高效筛选方法及研究进展

杨鸿雁¹, 单紫轩¹, 赖亮², 段俊¹, 汪锦才², 霍嘉茵³, 郭嘉亮^{1,2,*}

(1. 佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528000;

2. 暨南大学药学院, 广东广州 510632;

3. 佛山冯了性药业有限公司, 广东佛山 528000)

摘要: 面对耐药病原体的挑战, 天然抗微生物肽 (Antimicrobial peptide, AMP) 成为了开发新一代抗菌候选药物的重要来源之一, 在食品、农业等领域同样有着广泛的应用。然而, 从天然产物中快速筛选获得抗微生物肽仍然存在着低效、高耗等种种困难与挑战。本文首先介绍了抗微生物肽的作用机制 (包括膜作用机制与非膜作用机制); 然后重点综述了 AMP 的高效筛选方法, 包括整体细菌吸附结合法、细胞膜色谱法、磷脂膜色谱法、毛细管电泳法、比色法、薄层色谱法、荧光筛选法、高通量测序法和数据库挖掘法等; 此外, 展望了高效发掘抗微生物肽的发展方向。本论文为从纷繁复杂的天然产物体系中发现抗微生物肽提供了可参考的科学依据。

关键词: 抗微生物肽, 天然产物, 高效筛选, 膜作用机制

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0028-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030395



本文网刊:

A Review of Methods and Progress in Highly Efficient Screening of Antimicrobial Peptides from Natural Products

YANG Hongyan¹, SHAN Zixuan¹, LAI Liang², DUAN Jun¹, WANG Jincai², HUO Jiayin³, GUO Jialiang^{1,2,*}

(1. School of Medicine, Foshan University, Foshan 528000, China;

2. Pharmacy College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3. Sinopharm Group Fengliaoxing (Foshan) Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528000, China)

Abstract: Natural antimicrobial peptides (AMPs) are promising candidates for developing a generation of new antimicrobials to meet the challenge of antibiotic-resistant pathogens, and they are extensively applied in medicine, food, agriculture and other fields. However, the rapid screening of AMPs from natural products still has many difficulties and challenges, such as low efficiency and high consumption. This paper firstly introduces the action mechanism of AMPs (including membrane action mechanism and non-membrane action mechanism); then, the highly efficient screening methods of AMP are systematically reviewed, including bacterial adsorption, cell membrane chromatography, phospholipid membrane chromatography, capillary electrophoresis, colorimetry, thin layer chromatography, fluorescence screening, high-throughput sequencing, and mining databases screening. In addition, the development direction of efficient exploration of AMP is also prospected. This paper provides a scientific basis for the discovery of AMPs from complex natural product systems.

Key words: antimicrobial peptides; natural products; high-throughput screening; mechanism of membrane action

收稿日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81872832, 82173781); 广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金项目 (2019A1515010806); 广东省教育厅重点领域专项 (2020ZDZX2057); 佛山科学技术学院口腔医学科研培育项目。

作者简介: 杨鸿雁 (1998-) (ORCID: 0000-0001-9644-3057), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品药品分析研究, E-mail: 1695067778@qq.com。

* 通信作者: 郭嘉亮 (1983-) (ORCID: 0000-0002-0728-6406), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物活性成分筛选与分析, E-mail: janalguo@126.com。

抗生素的过度使用导致了“超级细菌”的产生, 人类可能面临“无药可用”的巨大风险。WHO 权威报告指出, 每年约 70 万人死于耐药细菌感染; 若无有效措施, 至 2050 年将造成每年超过 1000 万人死亡, 逾 100 万亿美元经济损失^[1-2]。然而, 过去 40 年里鲜见全新作用机制的抗生素获批准上市^[3-4]。这不仅对生物医药与大健康领域影响深远^[5], 同时也成为了我国畜牧业、水产养殖业及食品工业等领域可持续发展的重要桎梏。抗微生物肽(Antimicrobial peptide, AMP)亦作抗菌肽, 是生物体免疫防御产生的一类内源性小分子多肽, 与传统抗生素不同, AMP 以细菌细胞膜为作用靶点而非某一个特定的识别位点, 由于细胞膜的结构和组分是细菌进化过程中最保守的部分之一, 故难以产生广泛耐药性^[6-7]。此外, AMP 还具有抗菌谱广、热稳定性好、水溶性佳、免疫原性低等优点, 因此被视为抗生素的最佳“替代物”^[6]。鉴于其重要性, 本文将重点介绍天然产物中 AMP 的高效筛选方法及研究进展。

目前, 正处于临床试验阶段的 AMP 药物达数百种^[8], 当中不乏 Daptomycin^[9]、Omigan^[10]、Pexiganan^[11] 明星分子。近年来, 随着研究的深入, 科学家发现某些抗细菌肽类对部分真菌、原虫、病毒及癌细胞等均具有强有力的杀伤作用, 因而旧有命名: “抗菌肽”, 则显得较为局限容易造成误解, 故对这类活性多肽的命名越来越多科学家倾向于称之为“抗微生物肽”或者“多肽抗生素”(Peptide antibiotics), 下文将统一称为抗微生物肽(AMP)。如今, AMP 在农业、畜牧业、食品工业等领域均有着广泛的应用, 已逐渐成为了国内外学者关注的热点。

值得关注的是, 专业 AMP 数据库(Antimicrobial peptide database, APD)累计收录超 5000 种 AMP^[8], 但当中接近一半是通过人工合成得到。合成肽普遍通过化学手段将氨基酸依次定向缩合而成, 无法避免合成长度有限、个别序列难以获得、成本高昂等技术难题, 而且在突破结构限制、实现骨架创新上存在先天性的不足^[12]。天然产物是由生命系统产生的化学成分, 或者说是由动物、植物、微生物以及海洋生物等产生的特征次生代谢物。相较之下, 生物多样性(Biodiversity)决定了天然产物来源的 AMP 具有来源丰富、结构多样、骨架新颖等无可比拟的优势^[13]。自从 1980 年瑞典科学家 Hultmark 等^[14] 在天蚕蛹发现具有抗菌活性多肽天蚕素以来, 从天然产物中发现的 AMP 分布极其广泛, 包括哺乳动物、甲壳动物、鱼类、昆虫、两栖动物、鸟类到植物、细菌和病毒等。

然而, 迄今为止已发现的天然 AMP 尚不足 3000 种, 挖掘率较低(不足 0.1%^[8])。究其原因, 一方面在于其在生物组织中含量极低, 如一只成年工蜂蜇刺分泌的蜂毒肽仅有数十微升(μL), 蝎子及蜘蛛的产量更是低至纳升(nL)级别, 这难以满足多数分离筛选模式对受试量的要求^[15]; 另一方面在于传统筛选方法

在分析通量、分析效率、分析内涵上均存在重大缺陷, 严重制约了从纷繁复杂的天然产物中筛选发现 AMP 成分。而今, 关于 AMP 的结构、生物活性及实际应用的研究进展已有不少综述, 本文将重点关注 AMP 作用机制及其高效筛选方法的研究进展, 以期天然产物来源 AMP 的进一步研究利用提供科学依据。

1 抗微生物肽的作用机制

AMP 的作用机制主要包括膜作用机制与非膜作用机制。无论哪种机制, AMP 与细胞膜的结合都是公认的入侵病原体的首要和关键步骤, 因此 AMP 的作用机制为实现其高效、快速、简便的分离提供了一种重要的依据和启示^[16]。

1.1 膜作用机制

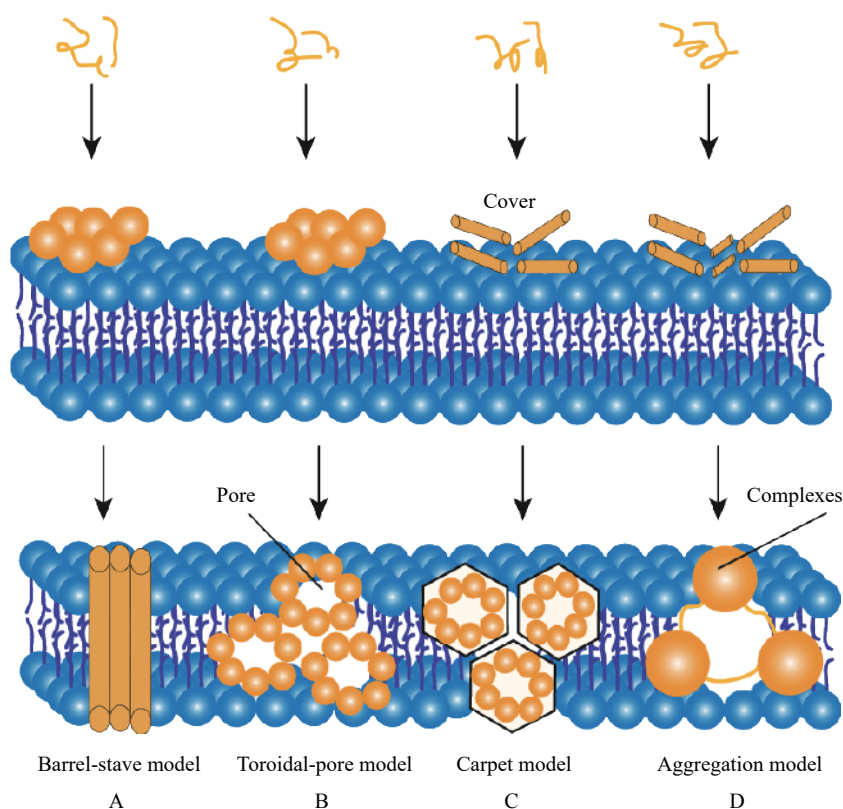
普遍认为 AMP 穿过细胞壁后, 带正电荷的 AMP 与细胞膜通过静电引力发生作用, 在细胞膜上形成穿膜孔, 使细胞膜裂解, 导致靶细胞死亡^[17-18]。当前膜作用机制有桶板模型、毯式模型、环膜孔模型, 凝集模型、电穿孔模型、离子载体模型、无规则的环形模型等等膜作用方式。本文仅介绍以下比较常见的四种模型, 相关机理如图 1 所示。

桶板模型(Barrel-stave model)是指 AMP 单体以螺旋形式通过静电作用结合到膜上, 然后螺旋体插入细胞膜的疏水孔, AMP 的疏水性区域与双分子层的磷脂双分子层结合, 多个分子在膜中心呈束状排列, 构成中空的管腔结构(图 1A), 形似这一结构类似木桶形状, 随着肽单体的聚集, 孔隙增大, 细胞内容物外泄导致细胞死亡, 采用这种机制的 AMP, 一般包含双亲性的 α -螺旋、疏水性的 α -螺旋或 β -折叠片层结构, 或同时具备这些结构, 这是 AMP 形成穿膜孔洞发挥作用所必需的^[19-20]。

环膜孔模型(Toroidal-pore model)是指 AMP 分子以静电作用吸附在细胞膜上, 并诱导细胞膜的磷脂单分子层发生连续弯曲直至形成穿孔(图 1B), 因此形成了由 AMP 分子和磷脂亲水端分子共同组成的亲水性环孔。与桶板模型不同的是, 此模板中孔洞的内表面是由磷脂亲水部分和 AMP 的亲水部分共同组成, 而桶板模型的孔洞内表面由 AMP 的亲水部分组成^[21-22]。

毯式模型(Carpet model)是指 AMP 分子与细胞膜上带负电的磷脂亲水端相互吸引, AMP 并不插入细胞膜内而是先像地毯一样覆盖在磷脂双分子层的表面(图 1C 上)。当 AMP 在细胞膜上的浓度达到一定的浓度后, 细胞膜稳定性降低, 导致完整性丧失, 其它 AMP 分子由此进入膜内(图 1C 下), 导致脂双分子层弯曲、菌膜破裂、胞内物外渗, 引起细菌死亡^[23-24]。

凝集模型(Aggregation model)是指阳离子肽直接与革兰氏阴性菌的外膜脂多糖或革兰氏阳性菌的细胞壁肽聚糖相互作用结合成复合物(图 1D)。凝集的细胞易发生被吞噬, 是获得细胞杀死机制的深入了

图 1 AMP 的膜作用机制^[21-22]Fig.1 Membrane action mechanism of AMP^[21-22]

解所必需的^[25-26]。到现在为止,天然产物中 AMP 成分的高效筛选方法大部分都是基于 AMP 与膜的相互作用发展而来。

1.2 非膜作用机制

近年,有新的观点认为 AMP 的作用机制除了上述描述的多种模型的膜作用方式外,还有非膜作用的方式。非膜作用方式主要分为胞内作用机制和胞外作用机制,包括与 DNA 结合、抑制 DNA 转录和复制、抑制蛋白合成和折叠、抑制细胞壁合成、抑制酶活性、影响细胞分裂等^[27-29]。核酸和蛋白质等相互作用,从而通过对基因转录、翻译和表达的调控,或者抑制胞内某些蛋白质的功能发挥而抑制和杀死细菌。如 AMP S-thanatin 是通过抑制细菌的呼吸作用来杀灭细菌,它可与脂多糖在体外及多重耐药性大肠杆菌所致脓毒性休克小鼠模型中发生相互作用^[30]; AMP P7 不是作用细胞膜的作用机制,而是抑制 DNA 的复制,在 P7 的影响下,参与大肠杆菌 DNA 复制相关的基因的表达下降,还抑制大肠杆菌 DNA 和 RNA 的合成^[31]。

需注意的是,无论 AMP 作用于膜作用机制还是非膜作用机制中,AMP 都需要与细菌细胞膜发生相互作用。有些 AMP 可在细胞膜上形成瞬间通道,进入胞内发生作用;甚至有 AMP 通过粘附于细胞膜上,在不破坏膜结构、保持膜结构完整的情况下导致菌体死亡。

2 AMP 的高效筛选方法

天然 AMP 来源于生物体的不同部位,样品复

杂、多样,如何快速锁定和获得 AMP 成分是目前难点问题。当今,AMP 的筛选普遍采用“抗生素之父”瓦克斯曼开发的经典方法(Waksman's approach)进行筛选^[32],即将制备好的粗肽经逐级、反复柱色谱分离纯化,结合抗菌实验得到纯化的单一 AMP。此法依循“活性制导分离”(Bioassay-guided fractionation, BGF)策略,以整体活性为导向,先分离、后鉴定、再逐一评价。该过程线性分析通量低、单次检测信息量有限,导致工作量大、效率低、成本高、周期长,容易造成微量活性成分丢失,且肽的活性在冗长的分离过程中必然受到影响。显然,传统筛选方法在分析通量、分析效率、分析内涵上均存在重大缺陷,严重制约了从天然产物复杂体系中筛选发现 AMP 成分。近年,涌现出多种新型的 AMP 筛选方法,包括整体细菌吸附结合法、细胞膜色谱法、磷脂膜色谱法、毛细管电泳法、比色法(上述基于膜作用机制为主),以及薄层色谱法、荧光筛选法、高通量测序法以及数据库挖掘法等(基于非膜作用机制为主),其应用比较如表 1 所示。通过综合利用多种与抗菌活性相关的理化参数或结构参数对肽进行分级筛选,再对得到的多肽序列进行评估分析,最终获得所需的 AMP。

2.1 整体细菌吸附结合法

整体细菌吸附结合法(Bacterial adsorption)是利用 AMP 与细菌细胞膜通过静电作用,对比整体细菌混合孵育前后所得液相色谱差异峰,获得潜在 AMP 成分所在色谱峰位置以此筛选出所需 AMP。Pei 等^[33]利用黄油加工后的副产品废奶,将其旋转蒸发浓

表 1 AMP 的高效筛选方法的汇总与比较

Table 1 Summary and comparison of efficient screening methods for AMP

筛选方法	AMP来源	筛选的AMP
整体细菌吸附结合法	废弃牛奶; 大鲵的血液	Arg-Val-Met-Phe-Lys-Trp-Ala和Lys-Val-Ile-Ser-Met-Ile ^[33] ; andricin B ^[34]
细胞膜色谱法	麻风树粕蛋白籽粕; 鳀鱼提取物	JCpep7 ^[35] ; Apep10 ^[36]
磷脂膜色谱法	卵蛋白水解物	Opep12 ^[37]
毛细管电泳法	12条已知序列的阳离子AMP化合物 大白蛉幼虫血淋巴提取物	HAL系列和HYL系列AMP ^[38] ; 二肽 β -丙氨酰酪氨酸(β -Ala-Tyr) ^[39]
比色法	磷脂和聚合二乙炔脂质组成的囊泡; 亚洲海洋蛤蚧	K7L-毒蜂肽和W19-毒蜂肽 ^[40] ; Perinerin ^[41]
薄层色谱法	自行合成的10条粗肽	CAMEL和脂肽PAL-KK-NH ₂ 、Pal-KGK-NH ₂ ^[42]
荧光筛选法	群居性蜜蜂(<i>Lasioglossum laticeps</i>)的毒液; β -半乳糖苷酶	Lasioglossin LL-III ^[43] ; 肽GKH175W和KNK5W ^[44]
高通量测序法	两栖类涂鱼	血红蛋白 β 1和淀粉样蛋白 ^[45]
数据库挖掘法	AMP数据库; 牛乳肽数据库; Fish-T1K数据库	DASamPI ^[46] 、 乳源AMP ^[47] 、 小免疫肽 ^[48]

缩再添加相应的酶进行水解, 与水热法制备的纳米磁性脂质体结合, 在 37 °C 下孵育 24 h, 经分离纯化, 测定吸光度并比较峰值, 筛选出两种抗菌肽并确定其氨基酸序列, 即 Arg-Val-Met-Phe-Lys-Trp-Ala 和 Lys-Val-Ile-Ser-Met-Ile。Pei 等^[34] 用同样的方法将磁性脂质体吸附与反相高效液相色谱相结合, 从大鲵的血液中筛选出新的抗菌肽, 通过 N 末端测序确定氨基酸序列, 为 Gly-Leu-Thr-ArgLeu-Phe-Ser-Val-Ile-Lys, 将其命名为 andricin B。该方法与传统方法相比, 操作简便, 大幅缩短了筛选时间, 具有很好的开发应用价值。然而, 活体细菌可能会吸附粗肽中其他蛋白成分, 导致筛选准确性降低, 加大后续分离难度。

2.2 细胞膜色谱法

细胞膜色谱法(Cell membrane chromatography, CMC)是将细胞膜结合到硅胶表面, 制成细胞膜固定相, 再利用色谱学技术研究药物与受体之间的相互作用规律的方法。AMP 与细胞膜发生相互作用, 使其在色谱上保留增强, 从而快速将 AMP 成分从复杂体系中分离出来。Xiao 等^[35] 使用小鼠心房细胞膜制备的细胞膜亲和层析柱成功地从麻风树粕蛋白粉(*Jatropha curcas* L.)籽粕(Seed cake)中筛选获得阳离子麻风树 AMP(KVFLGLK 与 JCpep7), 通过抑菌活性测试发现, JCpep7 对伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有较强的抗菌活性。值得注意的是, 相比于革兰氏阴性菌, JCpep7 对革兰氏阳性菌更为敏感。Tang 等^[36] 利用大肠杆菌细胞膜制得的细菌细胞膜脂质体色谱柱(Bacterial membrane liposome chromatography, IBMLC), 从鳀鱼提取物中, 纯化获得了一种新型阳离子 AMP: Apep10。抑菌活性测定结果表明, Apep10 对大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌具有抑制作用, MIC 值范围为 8~64 μ g/mL; 溶血实验也表明, 低于 20 μ g/mL 的 Apep10 对小鼠红细胞几乎没有细胞毒性, 是一种潜在的食品

防腐剂和抗菌药物。显然, 细胞膜色谱法比传统的活性制导分离法具有更高效、更快速、更灵敏及可重复性高的优势, 但是该方法需将收集的菌膜包覆在大孔硅胶上, 制备过程较为繁琐, 且在筛选过程中细胞膜容易流失及失去活性, 使用寿命较短、成本也相对较高; 同时, 对细胞膜的高需求以及较低的 AMP 捕获量, 限制了其大规模应用。

2.3 磷脂膜色谱法

深入研究表明细菌细胞膜由磷脂双分子层与镶嵌蛋白质构成, 磷脂双分子层是细胞膜的基本骨架, 主要成分包括磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholin, PC)、磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PG)、心磷脂(Cardiolipin, CL)等, 而 AMP 正是通过对特定磷脂成分(如 PG 和/或 CL 等)的特异性识别而发挥作用。磷脂膜色谱法(Phospholipid membrane chromatography)正是模拟磷脂膜来构建人工模拟细胞膜, 用不同方法, 从不同角度探究 AMP 与磷脂膜之间的作用。Tang 等^[37] 使用蛋黄磷脂酰胆碱(Egg-yolk phosphatidylcholine, EYPC)和二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(Dimyristoyl-sn-glycero-phosphatidylglycerol, DMPG)为单体, 构建人工模拟细胞膜固定相, 以此模拟 AMP 与细胞膜的相互作用, 结合固相萃取与高效液相技术, 成功从卵白蛋白水解物中筛选到新型 AMP Opep12(肽序为: RVASMASEKMKI), 该 AMP 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑菌活性。该方法是细胞膜色谱法的延伸, 使用仿生磷脂模拟生物细胞膜, 可避免生物菌膜活性降低及细胞膜大规模获取困难的问题, 具有使用寿命长、可选择性多、操作简单、制备简易等优点, 在保证特异性的基础上大幅提高其稳定性。但是, 磷脂膜色谱法与真实的活性细胞膜还存在着一定的区别; 此外, 受限于商品化磷脂的种类, 这些模拟细胞膜材料在仿生性和特异性上还有所欠缺。

2.4 毛细管电泳法

毛细管电泳法(Capillary electrophoresis, CE)是

基于 AMP 有效电荷和相对分子质量比例与离子迁移率的高度相关性,实现对已知氨基酸序列 AMP 的筛选。其核心仍然是基于 AMP 与膜结合的原理,建立与活菌结合的毛细管电泳模型,利用模型中的两者亲和力作用实现筛选。Tůmová等^[38]选取 12 条已知序列的阳离子 AMP 化合物(在可变区域设定 3~7 个碱性氨基酸),构建毛细管电泳模型,分别考察 AMP 有效电荷以及离子迁移率等物理-化学参数。结果表明,采用毛细管电泳法测定聚阳离子 AMP 的有效电荷和离子迁移率呈相关性,发现了具有 10~12 个氨基酸残基的较短 HAL 型 AMP 的有效电荷与相对分子质量之比高于具有 4~6 个较长氨基酸残基的 HYL 型 AMP。Šolínová等^[39]采用此方法通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析,从大白蛉幼虫血淋巴提取物中分离出二肽 β -丙氨酰酪氨酸(β -Ala-Tyr),对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有抗菌活性,也有抗真菌性。CE 法筛选效率高、重现性好、筛选速度快,但目前理论依据尚不完善,技术不成熟,因此存在明显局限性,易造成漏检和错检,故国内外的报道较少。

2.5 比色法

比色法(Colorimetry)是通过比较或测量有色物质溶液颜色深度来检测待测组分的方法。Jelinek等^[40]通过利用基于磷脂和聚合物聚二乙炔(Polydiacetylene, PDA)脂质组成的囊泡与 AMP 相互作用时表现出显著的颜色变化,从而实现 AMP(K7L-蜂毒肽和 W19-蜂毒肽)的筛选。Pan 等^[41]用此方法对亚洲海洋蛤蜊 *Perinereis aibuhitensis* Grube 的匀浆经浓缩、纯化、汇集吸收峰并在冻干后测定微生物的活性,发现了一种新肽命名为: Perinerin,对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌和真菌均显示出显著的活性,这也表明具有杀菌作用。Perinerin 有可能作为一种方便的“评估标记”来研究宿主生物化学的变化,特别是在环境变化方面。此类方法甚至能在几秒内得到天然肽类似物,并提供有关肽-膜相互作用和膜通透性机制的结构和功能信息,具有操作简单、快速有效等优势;但同时适用范围有限,选择性待提高。

2.6 薄层色谱法

薄层色谱法(Thin layer chromatography, TLC)是采用薄层色谱分离和生物活性测定相结合的生物技术,是一种直观、可视化的筛选方法。Jaskiewicz 等^[42]提出了一种快速分离、筛选 AMP 的薄层色谱法,粗肽在薄层板上分离后,将预先制备的板加入微生物悬浮液并进行孵化,用细胞染色剂刃天青(Resazurin)预处理薄层板,潜在 AMP 成分将会在该区域出现染色的黄色斑点;使用标准 AMP 进行试验,证实了方法的可行性。其中 CAMEL(KWKLFKKIGAVLKV-L-NH₂)和脂肽 PAL-KK-NH₂、Pal-KGK-NH₂ 在最低浓度下的抗菌活性最有效。Ramya 等^[49]用此方法对海蛞蝓中的抗菌化合物进行筛选,使用丙酮、丁酮、乙醇等不同溶剂的提取,在硅胶板均匀厚涂提取物并

喷洒定位试剂(茚三酮试剂)时,观察到 TLC 板上出现紫色至粉红色斑点;该板显示粉红色斑点,表明存在氨基酸和肽。该方法为快速有效地筛选活性肽提供了可能性,可直观从薄层板中找到潜在的 AMP 成分,然而该方法的分离能力有限,仅适用于简单样品的分析,难以满足复杂体系的分离与筛选。

2.7 荧光筛选法

荧光筛选法(Fluorescence screening)是一种通过使用荧光染料检查细胞对荧光染料的摄取情况或者测量细胞内成分泄漏来筛选 AMP 的方法^[50]。Kodedová等^[43]通过使用新开发的荧光 diS-C3(3)检测方法 与 96 微孔板结合,从群居性蜜蜂(*Lasioglossum laticeps*)的毒液中分离出 Lasioglossin LL-III,测试并比较了蜜蜂毒液中分离的肽及其合成类似物,对念珠菌的 7 种菌株,具有生物技术潜力的非传统酵母和 14 株酿酒酵母均有效。Pasupuleti 等^[44]利用 β -半乳糖苷酶能降解非显色底物邻硝基苯基 β -D-吡喃半乳糖苷(β -D-galactopyranoside, ONPG)为显色底物邻硝基苯酚(O-Nitrophenolate, ONP)的特性,通过 AMP 将 β -半乳糖苷酶从大肠杆菌细胞质中流出来并切割 ONPG 以产生 ONP,该方法可在 4 h 内得出化合物的抗菌活性,测定肽 GKH175W 和 KNK5W 在低 pH 和高盐浓度的有效性。该方法筛选灵敏度高、消耗量少、快速、成本低,精确度高且不需要载体,但可测量的化合物数量少,有些化合物反应荧光持续的时间较短,荧光的发散方向不集中。

2.8 高通量测序法

基于基因的高通量测序的筛选方法(High-throughput sequencing, HTS)是近几年正在发展的新兴的 AMP 筛选技术之一,根据 AMP 的基因具有同源序列相似性的特点实施精准筛选。Yi 等^[45]用此方法根据弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*, BP)和大鳍弹涂鱼(*Periophthalmus magnuspinnatus*, PM)的基因组和转录,鉴定出 507 个 AMP 转录本。在被鉴定的 AMP 中,449 个序列是此前未曾出现的,且大部分的 AMP 在两种弹涂鱼中的转录模式是不同的,并发现两种 AMP(血红蛋白 β 1 和淀粉样蛋白),对藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)具有高度抑制作用。该方法高效快速,可一次性获得大量 AMP 的信息,但具有一定局限性,必须依赖已知的 AMP 的基因为模板预测基因序列,并且只对同源物种有效。目前常规分析软件已经不能满足大量的数据资料的需求,只有进一步发展出快速准确的分析软件和方法才能更好地展现高通量测序技术的优势和应用价值。

2.9 数据库挖掘法

数据库挖掘法(Mining databases screening)是在生物活性筛选之前,利用数据库中的分子对接软件模拟目标靶点与候选药物之间的相互作用,计算两者之间的亲和力大小,以降低实际筛选化合物数目,同时提高先导化合物发现效率。AMP 数据库挖掘法包含

来自不同生物来源的候选肽,如细菌、昆虫、蛛形纲动物、被膜动物、两栖动物、鱼类和哺乳动物等。Menousek 等^[46]基于“APD 专业数据库”评估了 30 种潜在的肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的抑制效果,发现了 6 种有效的抗 MRSA 候选药物,并获得了一种易于生产的合成类 AMP(DASamp1),其能有效防止金黄色葡萄球菌生物膜建立。Liu 等^[47]对自建的“内源性牛乳肽数据库”进行虚拟筛选,筛选出 248 种多肽中有 23 个被确定为具有抗菌作用的候选肽,利用此方法表明乳源 AMP 可能作为功能性食品成分,有助于揭示乳抗感染作用的分子机制。Yi 等^[48]利用“Fish-T1K 数据库”通过转录组生成的扩展数据集高通量筛选出小免疫肽和 AMP,获得了来自 87 个鳃转录组的小免疫相关肽的大规模数据集,首次阐明不同生境和遗传对小免疫肽和 AMP 转录数的影响。此外,Universal Protein、ZINC 数据库等数据库也是 AMP 筛选较为常用的数据库。

近年,人工智能法(Artificial intelligence, AI)飞速发展,深度学习(Deep learning)模型为人们从天然产物中快速发现 AMP 提供了划时代的“武器”;同时,也推动非监督式或半监督式的特征学习和分层特征提取高效算法的发展,可替代固定数据库挖掘模型的手工获取特征。如 Chen 和他的研究团队^[51]采用自然语言学习(Nature language processing, NLP)的多种神经网络方法,把氨基酸序列作为学习语言,训练人工智能学习现有 AMP 的组织方式,根据经验识别氨基酸短序列,区分相似的多肽。这种模式提高了筛选的“洞察力”及“自动学习性”。通过选取三种 NLP 神经网络模型来预测鉴定,该研究实现了 AMP 挖掘模型的构建和优化:在测试集中,该模型的精确度达到了 91.31%;对 1 万多个天然来源微生物组进行筛选后,发现 216 种潜在的新型 AMP,其中 83.8% 具有抗菌活性。

综上可见该方法效率高、成本较低、精确度高、实时性强,加快 AMP 的检索速度且保证 AMP 数据的一致性和安全性,但其结果尚需要进一步验证,一般仅适合初筛。

3 总结及展望

天然 AMP 具有广泛的生物活性存在于各种生物体内,其作为宿主防御系统的第一道防线备受关注。一般认为 AMP 的膜作用机制是最普遍的,但深入研究发现 AMP 还可能有多途径发挥作用,其多样性与作用机制研究还需深入研究。在过去的几十年里,AMP 传统的筛选方法中从步骤、效率、成本等方面得到大幅度提高。应运而生的众多高效、快速筛选新方法中,很大一部分方法需要特定的基因模板和载体,但并非所有的化合物都能产生荧光,因此限制了其发展。

近年,精密仪器加工技术的成熟,推动了许多新

的筛选策略突破传统 BGF 策略的桎梏,得到了长足的发展。展望未来,新兴的“近线超微分离”(At-line nanofractionation, ANF)高内涵筛选策略有可能成为 AMP 筛选的重要方法。其基本原理主要是复杂样本经色谱高效分离后分流,一部分进入高分辨质谱获取结构信息,另一部分经流分收集后同步进行生物活性评价获取活性数据;通过色谱、质谱及活性谱图的拟合实现筛选。近年,Kool 及其团队通过整合常规液相、质谱及自主改造的 384 孔板微流分收集装置,成功创建了基于 ANF 策略的筛选平台,应用于一系列天然产物的分析,从中发现了多种酶抑制剂活性成分^[52-55],证明了相关策略和技术的合理性;最近,Richardson 和 Kool 团队等合作,以 ANF 筛选模式为基础结合刃天青还原试验(Resazurin-reduction assay),从 41 种蛇毒毒液中筛选并鉴定得到 28 种抗菌活性蛋白^[56],说明了 ANF 策略用于抗菌活性成分的可行性。然而,常规液相的分析尺度存在明显的局限性,一般没有紫外吸收的 AMP 成分对相关检测器有一定要求,而且 384 孔板的分析通量也严重不足,刃天青还原试验评价抗菌活性也缺乏普适性,势必影响其 AMP 筛选上的推广。目前,有关 ANF 策略应用于 AMP 样品筛选上的研究尚鲜见报道,但在研究逻辑上的突破为 AMP 筛选揭示了一种全新的筛选方法与理念。

除了实筛以外,虚拟筛选也是未来重要的技术发展方向。随着机器学习的深入发展,或将进入 AMP 药物及活性成分虚选技术的高速发展阶段;也意味着甚至可通过海量的基因组数据,发掘主动设计、从头生产自然界不存在的 AMP。值得高度关注的是,微生物在复杂的人体环境中产生 AMP 的巨大潜能,提供了通过微生态关系从微生物组数据中直接发现活性成分的科学依据。综上所述,研究 AMP 动态作用机制的细节,有助于对其临床应用前景及可能产生的问题有充分的认识,使医疗、食品和农业等领域的研究开发更具有针对性,也为 AMP 的工业化制备、产业化规模扩大奠定了基础。

参考文献

- [1] KAHN L H. Antimicrobial resistance: A one health perspective[J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2017, 111(6): 255-260.
- [2] TANGCHAROENSATHIEN V, SATTAYAWUTTHIPONG W, KANJANAPIMAI S, et al. Antimicrobial resistance: From global agenda to national strategic plan, Thailand[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2017, 95(8): 599-603.
- [3] CHELLAT M F, RAGUZ L, RIEDL R. Targeting antibiotic resistance[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(23): 6600-6626.
- [4] SMITH P A, KOEHLER M F T, GIRGIS H S, et al. Optimized arylomycins are a new class of gram-negative antibiotics[J]. *Nature*, 2018, 561(7722): 189-194.
- [5] ATHANASIOU C I, KOPSINI A. Systematic review of the

- use of time series data in the study of antimicrobial consumption and *Pseudomonas aeruginosa* resistance[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2018, 15: 69–73.
- [6] SABATIER J-M. Antibacterial peptides[J]. *Antibiotics-Basel*, 2020, 9(4): 142.
- [7] WANG G. Human antimicrobial peptides and proteins[J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2014, 7(5): 545–594.
- [8] BOPARAI J K, SHARMA P K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2020, 27(1): 4–16.
- [9] CORTES-PENFIELD N, OLIVER N T, HUNTER A, et al. Daptomycin and combination daptomycin-ceftaroline as salvage therapy for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. *Infectious Diseases*, 2018, 50(8): 643–647.
- [10] NG S M S, TEO S W, YONG Y E, et al. Preliminary investigations into developing all-D Omiganan for treating mupirocin-resistant MRSA skin infections[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2017, 90(6): 1155–1160.
- [11] LAMB H M, WISEMAN L R. Pexiganan acetate[J]. *Drugs*, 1998, 56(6): 1047–1052.
- [12] CIOCIOLA T, GIOVATI L, CONTI S, et al. Natural and synthetic peptides with antifungal activity[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2016, 8(12): 1413–1433.
- [13] DEMIRCI H, MURPHY F, MURPHY E, et al. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1355–1355.
- [14] HULTMARK D, STEINER H, RASMUSON T, et al. Insect immunity. Purification and prosperities of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 106: 7–16.
- [15] PRASHANTH J R, HASABALLAH N, VETTER I. Pharmacological screening technologies for venom peptide discovery[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 127: 4–19.
- [16] NGUYEN L T, HANEY E F, VOGEL H J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action [J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(9): 464–472.
- [17] CIUMAC D, GONG H, HU X, et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 537: 163–185.
- [18] XHINDOLI D, PACOR S, BENINCASA M, et al. The human cathelicidin LL-37A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2016, 1858(3): 546–566.
- [19] BERGEN G, STROET M, CARON B, et al. Curved or linear? Predicting the 3-dimensional structure of α -helical antimicrobial peptides in an amphipathic environment[J]. *FEBS Letters*, 2020: 594.
- [20] YANG L, HARROUN T A, WEISS T M, et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 81(3): 1475–1485.
- [21] MIHAJLOVIC M, LAZARIDIS T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(3): 281A–281A.
- [22] SENGUPTA D, LEONTIADOU H, MARK A E, et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008, 1778(10): 2308–2317.
- [23] REDDY K V R, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: Premises and promises[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536–547.
- [24] TEIXEIRA V, FEIO M J, BASTOS M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes[J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(2): 149–177.
- [25] DAVID P, JAVIER A T, GUILLEM P E, et al. Insights into the antimicrobial mechanism of action of human RNase6: Structural determinants for bacterial cell agglutination and membrane permeation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 552.
- [26] SINHA S, ZHENG L, MU Y, et al. Structure and interactions of a host defense antimicrobial peptide thanatin in lipopolysaccharide micelles reveal mechanism of bacterial cell agglutination[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17795.
- [27] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(3): 238–250.
- [28] KRAGOL G, LOVAS S, VARADI G, et al. The antibacterial peptide pyrrolicocin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(10): 3016–3026.
- [29] UYTERHOEVEN E T, BUTLER C H, KO D, et al. Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II[J]. *Febs Letters*, 2008, 582(12): 1715–1718.
- [30] WU G, FAN X, LI L, et al. Interaction of antimicrobial peptide S-thanatin with lipopolysaccharide *in vitro* and in an experimental mouse model of septic shock caused by a multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 35(3): 250–254.
- [31] CHEN X, LI L. Non-membrane mechanisms of antimicrobial peptide P7 against *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(11): 1737–1745.
- [32] TUCKER A T, LEONARD S P, DUBOIS C D, et al. Discovery of next-generation antimicrobials through bacterial self-screening of surface-displayed peptide libraries[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 618.
- [33] PEI J J, JIANG H, LI X S, et al. Antimicrobial peptides sourced from post-butter processing waste yak milk protein hydrolysates[J]. *Amb Express*, 2017, 7: 217.
- [34] PEI J, FENG Z, REN T, et al. Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 66(1): 38–43.
- [35] XIAO J, ZHANG H, NIU L, et al. Efficient screening of a novel antimicrobial peptide from *Jatropha curcas* by cell membrane affinity chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(4): 1145–1151.
- [36] TANG W, ZHANG H, WANG L, et al. New cationic antimicrobial peptide screened from boiled-dried anchovies by immobi-

- lized bacterial membrane liposome chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(7): 1564–1571.
- [37] TANG W T, ZHANG H, WANG L, et al. Antimicrobial peptide isolated from ovalbumin hydrolysate by immobilized liposome-binding extraction[J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(4): 591–600.
- [38] TŮMOVÁ T, MONINCOVÁ L, NEŠUTA O, et al. Determination of effective charges and ionic mobilities of polycationic antimicrobial peptides by capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(16): 2018–2024.
- [39] ŠOLÍNOVÁ V, SÁZELOVÁ P, MÁŠOVÁ A. Application of capillary and free-flow zone electrophoresis for analysis and purification of antimicrobial β -alanyl-tyrosine from hemolymph of flesh-fly *Neobellieria bullata*[J]. *Molecules*, 2021, 26(18): 5636.
- [40] KOLUSHEVA S, BOYER L, JELINEK R. A colorimetric assay for rapid screening of antimicrobial peptides[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 225–227.
- [41] PAN W D, LIU X H, GE F, et al. Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* Grube and its partial characterization[J]. *Journal of Biochemistry*, 2004, 135(3): 297–304.
- [42] JASKIEWICZ M, ORLOWSKA M, OLIZAROWICZ G, et al. Rapid screening of antimicrobial synthetic peptides[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2016, 22(2): 155–161.
- [43] KODEDOVA M, SYCHROVA H. High-throughput fluorescence screening assay for the identification and comparison of antimicrobial peptides' activity on various yeast species[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 233: 26–33.
- [44] THIRUMALAI M K, ROY A, SANIKOMMU S, et al. A simple, robust enzymatic-based high throughput screening method for antimicrobial peptides discovery against *Escherichia coli*[J]. *Journal of Peptide Science*, 2014, 20(5): 341–348.
- [45] YI Y, YOU X, BIAN C, et al. High-throughput identification of antimicrobial peptides from amphibious mudskippers[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(11): 364.
- [46] MENOUSEK J, MISHRA B, HANKE M L, et al. Database screening and *in vivo* efficacy of antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(5): 402–406.
- [47] LIU Y, EICHLER J, PISCHETSRIEDER M. Virtual screening of a milk peptide database for the identification of food-derived antimicrobial peptides[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(11): 2243–2254.
- [48] YI Y, LŮ Y, YOU X, et al. High throughput screening of small immune peptides and antimicrobial peptides from the fish-T1K database[J]. *Genomics*, 2019, 111(3): 215–221.
- [49] RAMYA M S, SIVASUBRAMANIAN K, RAVICHANDRAN S, et al. Screening of antimicrobial compound from the sea slug *Armina babai*[J]. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2014, 9(3): 268–274.
- [50] LEE W, LEE D G. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2015, 1848(2): 673–679.
- [51] ZIETEK B M, KBM S, JASCHUSCH K, et al. Identification of antimicrobial peptides from the human gut microbiome using deep learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40: 838–839.
- [52] MARIJA, MLADIC, BARBARA M, et al. At-line nanofractionation with parallel mass spectrometry and bioactivity assessment for the rapid screening of thrombin and factor Xa inhibitors in snake venoms[J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2016, 110: 79–89.
- [53] OTVOS R A, VAN NIEROP P, NIESEN W M A, et al. Development of an online cell-based bioactivity screening method by coupling liquid chromatography to flow cytometry with parallel mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(9): 4825–4832.
- [54] XIE C, ALBULESCU L, BITTENBINDER M A, et al. Neutralizing effects of small molecule inhibitors and metal chelators on coagulopathic Viperinae snake venom toxins[J]. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 2020(9): 129643.
- [55] ZIETEK B M, KBM S, JASCHUSCH K, et al. Bioactivity profiling of small-volume samples by nano liquid chromatography coupled to microarray bioassaying using high-resolution fractionation[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(16): 10458–10466.
- [56] MLADIC M, SLAGBOOM J, KOOL J, et al. Detection and identification of antibacterial proteins in snake venoms using at-line nanofractionation coupled to LC-MS[J]. *Toxicon*, 2018: 155.