

## 抗菌肽butorin II衍生物抑制细菌核酸合成的机制研究

苏冠芳<sup>1</sup> 郝刚<sup>2</sup> 李莉蓉<sup>1</sup> 施用晖<sup>1</sup> 乐国伟<sup>1,\*</sup>

(1 江南大学食品学院 食品营养与功能因子研究中心, 无锡 214122; 2 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘要:** **目的** 探究抗菌肽butorin II的衍生物butorin II-A(BF2-A)和butorin II-B(BF2-B)对细菌的胞内抑菌作用机制。**方法** 体外用原子力显微镜观察抗菌肽与基因组DNA的结合情况, 荧光光谱分析肽与基因组DNA的结合方式。体内用透射电镜观察抗菌肽作用后金黄色葡萄球菌细胞膜超微结构的变化, 流式细胞仪分析肽对金黄色葡萄球菌细胞周期的影响。最后通过凝胶阻滞实验推测肽与金黄色葡萄球菌DNA合成相关基因的结合引起了细胞周期的改变。**结果** 肽与基因组DNA发生了结合, 与溴化乙锭(EB)竞争性嵌入基因组DNA; BF2-A/BF2-B与金黄色葡萄球菌作用后几乎在不破坏细胞膜的情况下渗透进入胞内, 与DNA合成相关基因发生了结合, 特异性阻滞细胞周期中的DNA合成阶段; 肽与DNA合成相关基因发生了结合。另外, 所有的实验结果显示了BF2-B穿透细胞、与DNA结合的能力及对细胞周期的影响强于BF2-A。**结论** BF2-A/BF2-B与DNA穿过金黄色葡萄球菌细胞膜后在细胞内通过与DNA结合, 特异性的将细胞阻滞在了细胞周期的DNA合成期而发挥了抑菌作用, 而且BF2-B的上述作用强于BF2-A。

**关键词:** 抗菌肽; 胞内抑菌机理; 细胞周期; 金黄色葡萄球菌

**中图分类号:** Q5 **文献标识码:** A

## Antibacterial peptides butorin II analogues on bacteria by inhibition of DNA synthesis

Su Guan-fang<sup>1</sup>, Hao Gang<sup>2</sup>, Li Li-rong<sup>1</sup>, Shi Yong-hui<sup>1</sup> and Le Guo-wei<sup>1</sup>

(1 Research Center of Food Nutrition and Function Factor, School of Food Science and Technology,

JiangNan University, Wuxi 214122; 2 School of Life Science and Technology,

Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041)

**Abstract Objective** To study the intracellular action of analogues butorin II-A (BF2-A) and butorin II-B (BF2-B) of the antimicrobial peptide butorin II on bacteria. **Methods** *In vitro*, the bond of genomic DNA with BF2-A/BF2-B and the change of DNA structure after the binding was investigated with atomic force microscope (AFM) and fluorescence spectra respectively, and the competitive intercalation of BF2-A/BF2-B and ethidium bromide (EB) into genomic DNA were analyzed by fluorescence spectra. *In vivo*, transmission electron microscope (TEM) observed the cell membrane ultrastructure of *Staphylococcus aureus* treated by BF2-A/BF2-B. Then flow cytometry analyzed the change of bacterial cell cycle after treated by BF2-A/BF2-B. Finally, binding action between peptide and genes related to DNA synthesis that was harvested by PCR were researched by gel retardation assay. **Results** BF2-A/BF2-B bond to DNA. Both the peptides could weaken the fluorescence intensity of EB-DNA complex. BF2-A/BF2-B penetrated into cell without destroying the cell membrane. Bacterial cell cycle after interactions of BF2-A/BF2-B

收稿日期: 2011-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31172214); 国家自然科学基金(No. 30871805)

作者简介: 苏冠芳, 女, 生于1987年, 在读硕士研究生, 主要从事食品营养与功能因子方面的研究。E-mail: suguanfang0909@163.com

\*通讯作者, E-mail: 13861691856@139.com

with bacteria specifically changed and BF2-A/BF2-B binded with key genes. Besides, all the experiments showed that BF2-B was stronger than BF2-A in the DNA-binding, membrane penetration and blocking the cell cycle. **Conclusion** BF2-A/BF2-B penetrated into bacteria, and block DNA synthesis phase of cell cycle of bacteria by binding to genes related to DNA synthesis specifically. Above effects of BF2-B are better than BF2-A.

**Key words** Antibacterial peptide; Intracellular action; Cell cycle; *Staphylococcus aureus*

抗菌肽已被发现对细菌和真菌有广泛的抑菌效果,而且无耐药性,显示了强大的抗菌活力。至于抗菌肽杀死目标微生物的机制,有两种假说,一种是,微生物的死亡可能是通过破坏膜的离子梯度功能而引起能量流失的累积效应。另一种可能是,抗菌肽可能通过扰乱细胞膜进入靶细胞,结合到未知的细胞内分子上,干扰它们的代谢功能。目前,有一些报道称,抗菌肽可以穿过膜直接作用于DNA/RNA来抑制细菌的生长。如,tachyplesin I被证明作用于DNA双链的小沟槽<sup>[1]</sup>;人类中性粒细胞肽-1的次要胞内靶点已在结核分枝杆菌H37Ra中找到<sup>[2]</sup>。分离自蟾蜍胃提取物的buforin II,被证明可以与大肠埃希菌的DNA和RNA结合<sup>[3]</sup>。但目前还不清楚的是,抗菌肽进入细菌胞内是否被吸引到某些DNA区域,特异性的引起相应细菌生理机能的变化。为此,我们研究了两个buforin II(BF2)的类似物,buforin II-A(BF2-A)(RAGLQFPVGRVHRLLRK)和buforin II-B(BF2-B)(RAGLQFPVGRLLRLLRLLR)。研究证明,这两个肽无论是对革兰阳性还是阴性菌都表现出比它们的母肽BF2更好的抑菌活性<sup>[4]</sup>,并初步探索了其与大肠埃希菌DNA结合所需浓度<sup>[5]</sup>(本实验采用的BF2-A/BF2-B浓度参考前人研究结果)。至于它们进入细菌体内后,在胞内与DNA结合的位置及结合后对细胞周期的影响尚未见研究报道。

本文首先观察BF2-A/BF2-B在体外与金黄色葡萄球菌基因组DNA的结合及结合方式。然后透射电镜确定抗菌肽BF2-A/BF2-B是否穿膜进入金黄色葡萄球菌胞内,流式细胞仪观察BF2-A/BF2-B阻滞了金黄色葡萄球菌细胞周期的哪个时期,最后验证BF2-A/BF2-B是通过与相关基因的结合而特异性的阻滞了细胞周期某一时期。现报告如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

透射电子显微镜H-7000型(日本日立公司);原子力显微镜(本原纳米仪器有限公司);荧光分光光度计650-60型(日本日立公司);流式细胞仪FACS Calibur(美国BD公司)。

衍生肽BF2-A/BF2-B(目的肽由上海波泰生物科技

有限公司采用固相化学合成法合成,纯度 $\geq 95\%$ );金黄色葡萄球菌,编号为ATCC 25923,为实验室保存;金黄色葡萄球菌基因组DNA为CTAB法<sup>[6]</sup>提取,紫外分光光度计检测其 $A_{260}/A_{280}=1.89>1.8$ ,符合实验要求;溴化乙锭(EB)购自Amersco公司;PCR所用引物由捷瑞公司合成;细胞周期试剂盒购自南京凯基生物公司)。其他试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 原子力显微镜观察抗菌肽与DNA的结合

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的金黄色葡萄球菌基因组DNA溶液中加入不同浓度的抗菌肽<sup>[5]</sup>,室温孵育10min。将抗菌肽-DNA复合物10 $\mu\text{L}$ 滴加到新鲜剥离的裸云母表面,倾斜45度,让液滴流过整个云母片,37 $^{\circ}\text{C}$ 下静置10min。干燥后将制备的样品置于原子力显微镜扫描台上用点触模式成像<sup>[7]</sup>。实验采用100 $\mu\text{m}$ 扫描器,氮化硅探针,针尖曲率半径约10nm,力常数约0158N/m或218N/m,扫描速率012-115Hz。图像用自带软件(IP 211版)平滑处理,消除低频背景噪音。

### 1.2.2 抗菌肽与EB竞争性结合DNA的荧光光谱分析

在试管中加入0.1 mg/mL的DNA溶液1 mL,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB溶液15 $\mu\text{L}$ ,再加入不同梯度浓度的抗菌肽溶液<sup>[5]</sup>,用Tris缓冲液调整总反应体积至2 mL。阴性对照为PBS缓冲液。在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中避光孵育10min,在550~750nm范围内进行荧光扫描<sup>[8]</sup>。狭缝设置为 $E_x=E_m=5\text{nm}$ ,激发波长 $\lambda=535\text{nm}$ ,样品池为1cm石英池。

### 1.2.3 透射电镜观察抗菌肽对细菌胞膜的影响

培养至对数期的金黄色葡萄球菌用PBS稀释至10 $^6$ CFU/mL,加入抗菌肽BF2-A/BF2-B,终浓度为5 $\times$ MIC<sup>[4]</sup>,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20min和2h。处理后的细菌细胞用2.5%的戊二醛/缓冲液固定1h。细胞再用1%的锇酸/缓冲液固定1h。用1%的乙酸双氧铀染色后用乙醇梯度脱水,然后包埋在树脂中。缓冲液为0.1mol/L的二甲胍酸钠缓冲液(pH7.4)。薄切片用弗姆瓦铜载网制备,用2%的乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色<sup>[9]</sup>。通过透射电镜观察抗菌肽对细菌胞膜的结果。

### 1.2.4 流式细胞仪分析抗菌肽对细菌细胞周期的影响

收集对数生长期细菌稀释成10 $^8$ CFU/mL的菌悬

液,加入BF2-A/BF2-B,终浓度为 $5\times\text{MIC}^{[4]}$ ,混匀,以无菌液体培养基为对照组。 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{r}/\text{min}$ 培养 $0.5\text{h}$ 。取上述待测样品 $1\text{mL}$ , $2000\text{r}/\text{min}$ 离心 $3\text{min}$ ,弃上清液,用磷酸缓冲液( $\text{pH}$ 值为 $7.0$ )洗涤 $3$ 次,加入预冷的 $70\%$ 乙醇 $1\text{mL}$ , $4^{\circ}\text{C}$ 固定 $30\text{min}$ 。用磷酸缓冲液洗涤 $3$ 次,加入细胞周期所用PI溶液 $1\text{mL}$ , $4^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 $30\text{min}$ 后,上机检测<sup>[10]</sup>。

### 1.2.5 凝胶阻滞分析抗菌肽与DNA合成相关基因结合

#### (1)引物设计及PCR法获得金黄色葡萄球菌DNA合成相关基因

为了验证上述推测,我们筛选了几种DNA合成相关基因,并通过DNA凝胶阻滞实验来验证了BF2-A/BF2-B与这几种相关基因结合。从GenBank中查找与金黄色葡萄球菌DNA合成相关基因:DNA促旋酶A亚基(*gyrA*)、复制起始子(DnaA)、DNA聚合酶III  $\beta$ 亚基(DNA polymerase III subunit beta)、DNA促旋酶B亚基(*gyrB*),设计并合成相应引物。取 $30\text{ng}$  DNA作为模板, $95^{\circ}\text{C}$ 变性 $120\text{s}$ 后,按 $95^{\circ}\text{C}$ 变性 $30\text{s}$ ,相应引物

退火温度退火 $30\text{s}$ , $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 $30\text{s}$ 进行 $30$ 轮PCR扩增。最后 $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 $10\text{min}$ 。

#### (2)DNA-肽结合凝胶阻滞实验

结合缓冲液( $5\%$ 甘油, $10\text{mmol}/\text{L}$  Tris-HCl  $\text{pH}8.0$ , $1\text{mmol}/\text{L}$  EDTA, $1\text{mmol}/\text{L}$  DTT, $20\text{mmol}/\text{L}$  KCl, $50\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA)溶解抗菌肽BF2-A/BF2-B。 $100\text{ng}$ 的DNA合成相关基因分别与 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BF2-A和 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BF2-B等体积混合<sup>[5]</sup>, $37^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴孵育 $10\text{min}$ 后进行 $2\%$ 的DNA琼脂糖凝胶电泳<sup>[11]</sup>。用UVP凝胶成像系统记录结果。

## 2 结果

### 2.1 原子力显微镜观察抗菌肽与DNA结合的结果

图1(a)是未加抗菌肽的DNA分子,白色的长链状物即为DNA分子,它松散舒展,链段较长,并且很多条DNA链相互聚集缠绕,形成一种较大的糊状的凝聚团。图1(b)是加入 $400\mu\text{g}/\text{mL}$  BF2-A后的DNA分子图像,图中明亮的白色小点为肽分子。可以看到DNA链上有很多这样的白色小亮点,形成串珠状

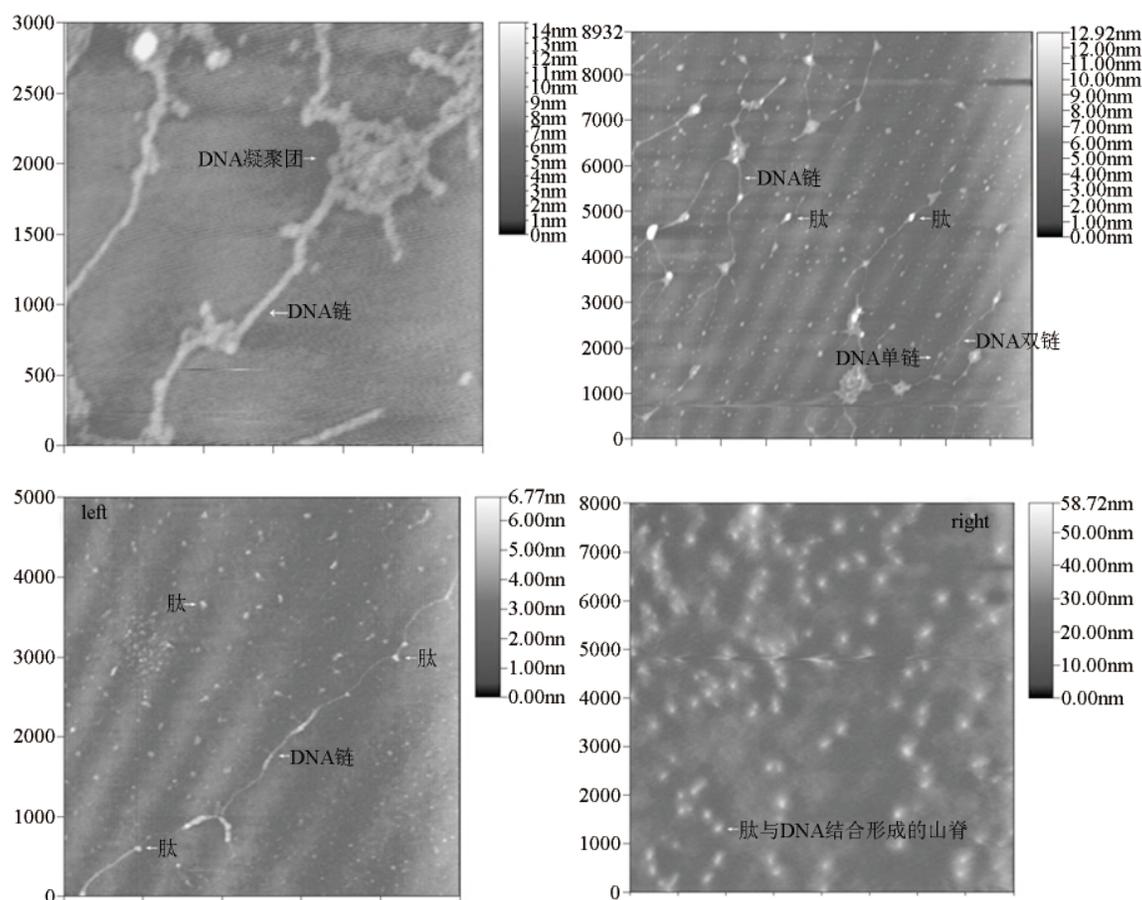


图1 BF2-A/BF2-B与基因组DNA的结合

Fig. 1 AFM image of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) genomic DNA with BF2-A/BF2-B.

复合物<sup>[12]</sup>。图1(c)是加入不同浓度的BF2-B后的DNA分子图像,在10 $\mu$ g/mL时(left),可以看到肽分子吸附在DNA链上;当400 $\mu$ g/mL(right)时,由于BF2-B与DNA的强烈结合作用,DNA链上吸附更多的肽分子,形成一个个突起的很高的山脊(白色小亮点)。

### 2.2 抗菌肽与EB竞争性结合DNA的荧光光谱分析结果

溴化乙啶(ethidium bromide, EB)是一种高度灵敏的荧光染色剂,含有一个可以嵌入DNA堆积碱基之间的三环平面基团。它与双链DNA的结合方式有两种:一是通过静电作用与双链DNA的磷酸骨架结合,此时其荧光性质不变;二是通过嵌入的方式插入双链DNA碱基对间,当染料分子插入后,其平面

基团与上下碱基相互作用,导致与DNA结合的EB呈现荧光,其荧光产率比游离溶液中染料有所增加,EB-DNA复合物的荧光产率比没有结合DNA的染料高出20~30倍。当它和能与DNA发生类似嵌入作用的分子共存时,便相互竞争与DNA的结合,使荧光强度减弱<sup>[6]</sup>。由图2可以看出,EB染料的荧光特征峰在610nm处,随着加入的抗菌肽BF2-A和BF2-B浓度不断增大,荧光强度明显降低。其中还能在BF2-B的图中看到其最大发射波长发生飘移,由610nm移向600nm附近。

### 2.3 透射电镜观察抗菌肽对细菌胞膜的影响结果

从图3的A、B可以看出,金黄色葡萄球菌与BF2-A

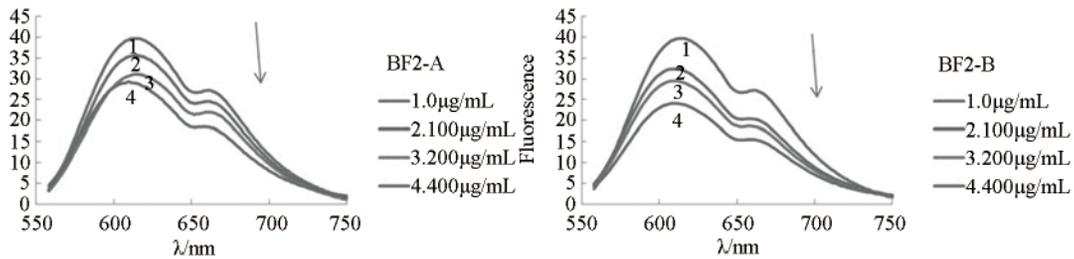
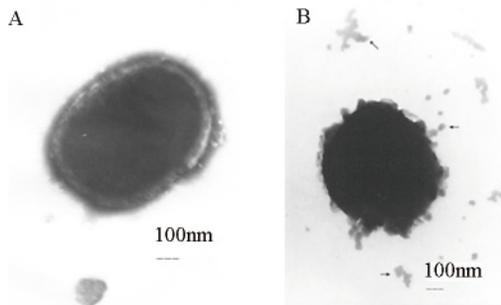


图2 抗菌肽对EB-DNA复合体系滴定的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of the titration of different concentration peptides of BF2-A/BF2-B on EB-DNA solution



注:箭头所指为从细胞中泄漏的内容物

图3 透射电镜观察金黄色葡萄球菌经BF2-A(A)和BF2-B(B)处理后的细胞膜超微结构变化

Fig. 3 Transmission electron micrographs of *S.aureus* treated by BF2-A for 20min (A) BF2-B for 20min (B)

作用20min后,细胞膜超微结构是完整的,而BF2-B只造成了轻微的细胞质泄漏。

### 2.4 流式细胞仪分析抗菌肽对细菌细胞周期的影响结果

在原核细胞生长周期中,DNA复制前的准备时期(I)相当于真核细胞的G<sub>1</sub>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,没有为细胞分裂做准备的G<sub>2</sub>期<sup>[13]</sup>。如图4所示,分别用BF2-A/BF2-B(5×MIC)处理20min后,位于G<sub>1</sub>期(I期)细菌数减少,而进入S

期(R期)的细菌数增加,对照组进入S期(R期)的细菌数只占总细胞数的42.33%,而BF2-A处理组S期(R期)的细菌数占49.23%,BF2-B处理组S期(R期)的细菌数占51.05%。(图中阴影面积大小显示了处于S期(R期)细菌所占的百分含量)

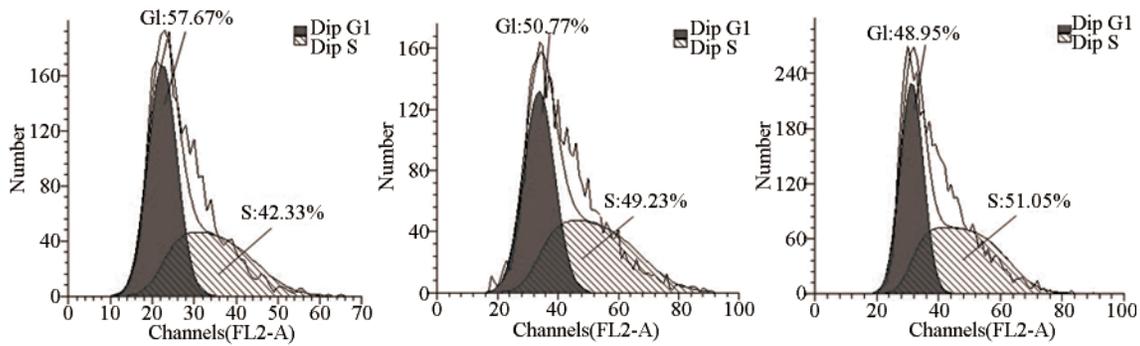
### 2.5 凝胶阻滞分析抗菌肽与DNA合成相关基因结合情况

引物序列、PCR扩增长度和退火温度如表1。

如图5所示,BF2-A/BF2-B与这几种关键基因均有很强结合能力。值得注意的是,400 $\mu$ g/mL的BF2-A和200 $\mu$ g/mL的BF2-B等体积作用于相同浓度的DNA片段后DNA均被阻滞在点样孔里,甚至BF2-B使得点样孔中的DNA荧光强度略暗于BF2-A。

### 3 讨论

现在很多研究都试图表征穿膜肽细胞内(尤其是核酸)的抑菌机制。如,pyrrolicorin<sup>[14]</sup>和indolicidin<sup>[15]</sup>,通过进入细菌细胞,并干扰细胞内的一些重要生理过程来发挥抑菌作用。为了进一步确定穿膜肽进入细胞后的结合位置及结合后对相应生理功能的影响,在本试验中我们用在buforin II结构基础上设计的BF2-A/BF2-B进行了探索。体外试验中,原子力显微镜证明了BF2-A/BF2-B与DNA结合,而且BF2-B



A: 阴性对照(金黄色葡萄球菌); B: 金黄色葡萄球菌+BF2-A(5MIC); C: 金黄色葡萄球菌+ BF2-B(5MIC)

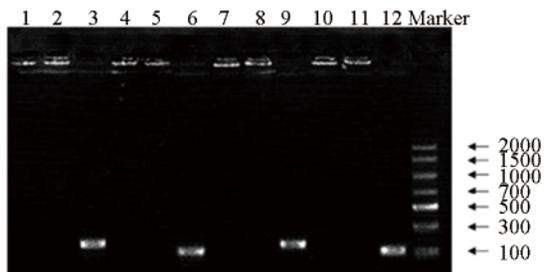
图4 抗菌肽对金黄色葡萄球菌细胞周期的影响

Fig. 4 The cell cycle of normal *S.aureus* and those treated by BF2-A/BF2-B (5MIC) for 20min by flow cytometry

表1 DNA合成相关基因引物

Tab. 1 Primers of genes related to DNA synthesis

Primer		Sequence (5' to 3')	Length	Annealing Temperature
DnaA	sense	AATAGCTATGTACTTGTCTAGAGAG	74bp	60°C
	antisense	ATGAGCATGAATGACGGT		
DNA polymerase III subunit beta	sense	ACGATGTTGAAGGTGGTAGCC	119bp	60°C
	antisense	TTGCGTTACCGAGTCGTCAC		
gyrB	sense	ATTCTGAAGTGCCTCAAGTTG	86bp	58°C
	antisense	ACGTGCCGCCATAATACC		
gyrA	sense	CAACGGGTGTGAAAGGTATTAC	127bp	60°C
	antisense	ACCACGATTTGATAAACGATAGTC		



1: BF2-A+DNA促旋酶A亚基; 2: BF2-B+DNA促旋酶A亚基; 3: DNA促旋酶A亚基; 4: BF2-A+复制起始子; 5: BF2-B+复制起始子; 6: 复制起始子; 7: BF2-A+DNA聚合酶III β亚基; 8: BF2-B+DNA聚合酶III β亚基; 9: DNA聚合酶III β亚基; 10: BF2-A+DNA促旋酶B亚基; 11: BF2-B+DNA促旋酶B亚基; 12: DNA促旋酶B亚基

图5 抗菌肽与DNA合成相关基因的凝胶阻滞电泳图

Fig. 5 Gel retardation electrophoresis of genes related to DNA synthesis binding with BF2-A/BF2-B

与DNA结合的更多，以至于从图中看上去形成了山脊，点触式扫描的纳米探针无法扫描到深谷中(DNA链)，因此无法看到DNA链，但顺着这些突起的小亮点，就是一条DNA链。有意思的是，在图1(b)上可以清楚的看到一条DNA双螺旋链被破坏成两条单链，并且这两单链上都附着白色小亮点——肽分子。这究竟是DNA断裂后，抗菌肽结合上去的还是

由于抗菌肽的作用，将DNA双链断裂成单链？抗菌肽是如何断裂DNA双螺旋的氢键？这是偶然的单个行为还是相互作用规律？这些问题还需要进一步的探讨研究。然后测定DNA-EB体系的荧光光谱通过荧光强度的变化来研究抗菌肽与金黄色葡萄球菌DNA的结合方式。结果表明，抗菌肽BF2-A/BF2-B能与EB竞争性的插入到DNA的碱基对中，使EB-DNA复合体系荧光减弱。而发生紫移是由于EB从DNA疏水环境进入到水溶液中，即抗菌肽取代了EB，这些都充分说明抗菌肽与DNA发生嵌入式结合。并且相同浓度下，BF2-B中EB-DNA复合体系荧光强度下降幅度比BF2-A大，说明BF2-B嵌入DNA碱基对的能力更强。

据Kobayashi等<sup>[16]</sup>的研究结果，buforin II采用类似于抗菌肽magainin 2的“孔”型机制穿过脂质双层。本课题组首先用透射电镜观察了BF2-A/BF2-B对金黄色葡萄球菌细胞膜的影响，发现BF2-A和BF2-B都穿过了细胞膜，细胞膜几乎保持完整，只有BF2-B造成了很轻微的细胞膜损伤，说明这两种抗菌肽都渗透进入细胞内，与细胞内的物质相互作用后产生抑菌作用，这与前人的研究结果相一致<sup>[4,16]</sup>。通过用流式细胞仪分别检测BF2-A/BF2-B进入细菌胞内后对细胞周期各

个时期的影响,发现与对照组相比,BF2-A/BF2-B处理组的细胞周期中S期(R期)细胞数目明显增加,G<sub>1</sub>期(I期)细胞数目减少,这说明BF2-A/BF2-B对金黄色葡萄球菌的作用发生在S期(R期),致使更多的细菌滞留S期(R期)。又因为S期(R期)是DNA合成期,这说明,BF2-A/BF2-B对DNA的合成起到抑制作用,推测可能是BF2-A/BF2-B与DNA合成相关基因结合后特异性抑制了DNA合成期。为了验证这个推测,我们筛选了几种DNA合成相关基因,并通过DNA凝胶阻滞实验来验证了BF2-A/BF2-B与这几种相关基因结合,而且由于BF2-A/BF2-B与这几种DNA合成相关基因的强烈结合,导致复合分子增大,使得电泳时DNA向正极的运动速度减慢,迁移率下降,以致使DNA片段无法跑出点样孔,尤其是BF2-B使得DNA荧光强度略暗于BF2-A。说明BF2-B与EB竞争性的插入到DNA碱基对中的能力比BF2-A强。值得注意的是,本实验中用到的BF2-A和BF2-B阻滞浓度比之前报道中<sup>[5]</sup>的阻滞浓度小,原因是本研究中的DNA片段长度在100~300bp间,比之前报道中用的总DNA分子量小很多。

本研究结果表明BF2-A/BF2-B有很好抑菌效果的重要原因之一是这两种肽穿过细胞膜进入胞内,与DNA合成相关基因以嵌入方式结合,然后将细胞特异性的阻滞在细胞周期的R期(S期),导致细菌无法分裂,从而达到抑菌目的。同时值得一提的是,在这项研究中的每一个实验都证明,BF2-B的抑菌效果优于BF2-A。虽然迄今发现的DNA结合肽非常有限,但这种抑菌机制确实存在。抗菌肽的细菌胞内抑菌机制值得深入研究。

### 参考文献

- [1] Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, *et al.* Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: Significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(11): 2998-3004.
- [2] Sharma S, Khuller G K. DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-1 against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra[J]. *Current Microbiology*, 2001, 43(1): 74-76.
- [3] Erika T U, Chase H B, Danette K, *et al.* Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of butorin II[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(12): 1715-1718.
- [4] Hao G, Shi Y H, Tang Y L, *et al.* The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide butorin 2P[J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1421-1427.
- [5] 郝刚,施用晖,唐亚丽,等. 抗菌肽Butorin II衍生物与大肠埃希菌基因组DNA的作用机制[J]. *微生物学报*, 2010, 50(3): 328-333.
- [6] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等译. 第三版. 科学出版社,北京,2002.
- [7] Zheng J P, Li Z, Wu A, *et al.* AFM studies of DNA structures on mica in the presence of alkaline earth metal ions[J]. *Biophys Chem*, 2003, 104(1): 37-43.
- [8] Qiao C, Bi S, Sun Y, *et al.* Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe[J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, 70(1): 136-143.
- [9] Chen A M, Shi Q S, Feng J, *et al.* Dissociation of outer membrane for *Escherichia coli* cell caused by cerium nitrate[J]. *J Rare Earths*, 2010, 28(2): 312-315.
- [10] Steen H B, Boye E. Bacterial growth studied by flow cytometry[J]. *Cytom*, 1980, 1(1): 32-36.
- [11] Park K H, Nan Y H, Park Y, *et al.* Cell specificity, anti-inflammatory activity, and plausible bactericidal mechanism of designed Trp-rich model antimicrobial peptides[J]. *BBA-Biomembr*, 2009, 1788(5): 1193-1203.
- [12] Lushnikov A Y, Potaman V N, Oussatcheva E A, *et al.* Site-specific labeling of supercoiled DNA[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(9): 152-158.
- [13] 王关林,唐金花,蒋丹,等. 苦参对鸡大肠埃希菌的抑菌作用及其机理研究[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 1018-1024.
- [14] Kragol G, Lovas S, Varadi G, *et al.* The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(10): 3016-3026.
- [15] Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 160(1): 91-96.
- [16] Kobayashi S, Chikushi A, Tougu S, *et al.* Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide butorin 2[J]. *Biochemistry*, 2009, 43(49): 15610-15616.