10-HDA 对枯草芽孢杆菌的抑菌机理研究

王瑞明，李俊霖，杨晓慧，王腾飞，王建彬
（齐鲁工业大学，山东省微生物工程重点实验室，山东济南 250353）

摘要：为了确定与分析 10-羟基-2-癸烯酸（10-HDA）的抑菌性能及其作用机制，采用牛津杯法，倍半稀释法进行抑菌性能测定实验。以枯草芽孢杆菌为供试菌，采用凝胶阻滞实验及原子力显微镜观察 10-HDA 与菌体 DNA 结合情况，并采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察 10-HDA 作用后菌体 DNA 含量的变化，以及 10-HDA 对菌体基因组 PCR 的影响。结果表明，10-HDA 对多种病原细菌具有明显的抑制作用，表现出广谱抗菌活性，且抑菌效果随着 10-HDA 浓度的增加显著提高。其中，对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度（MIC）为 0.62 mg/mL。DNA 琼脂糖凝胶电泳和原子力显微镜结果显示，当 10-HDA 浓度达到 0.62 mg/mL 时，菌体中基因组 DNA 的合成量明显减少，而且 10-HDA 与细菌基因组 DNA 紧密结合。对基因组 DNA 的 PCR 影响实验进一步证明，当 PCR 体系中 10-HDA 的浓度达到 1.0 mg/mL 时，DNA 的合成被完全阻碍。通过实验，我们得出 10-HDA 通过与细菌基因组 DNA 的结合，进一步阻碍 DNA 的合成，最终达到抑菌效果。

关键词：10-HDA；枯草芽孢杆菌；抑菌机理；基因组
文章篇号：1673-9078(2013)8-1862-1866

Antibacterial Activity and Mechanism of Action of 10-HDA against *Bacillus subtilis*

WANG Rui-ming, LI Jun-lin, YANG Xiao-hui, WANG Teng-fei, WANG Jian-bin
(Key Laboratory of Shandong Microbial Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

Abstract: Through oxford cup test and half dilution method for testing antibacterial activity, the preparation progress and antibacterial activity of 10-HDA against *Bacillus subtilis* were identified and analyzed in this paper. The quantity and bonding of bacteria DNA affected by 10-HDA were analyzed by using atomic force microscope (AFM) and agarose gel electrophoresis of DNA. The results showed that, 10-HDA was a broad-spectrum antimicrobial agent and had obvious inhibition effects on multiple pathogenic bacteria with a concentration-depended mode of inhibitory effect. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Bacillus subtilis* was 0.62 mg/mL. Agarose gel electrophoresis and AFM analyses revealed that the synthesis of DNA was rapidly decreased due to the close combination with 10-HDA. It was further proved by its impact on PCR of DNA that the synthesis of DNA could be completely impeded when the mixing concentration of 10-HDA was 1.0mg/ml. Therefore, bacteriostatic action was inferred to be caused by the combination between 10-HDA and DNA which inhibited the replication of DNA.

Key words: 10-HDA; *Bacillus subtilis*; antibacterial mechanism; genome

10-羟基-2-癸烯酸（10-hydroxy-2-decelenic acid, 简称 10-HDA）是由德国科学家 D.J.朗格（1921）首次在工蜂上颚腺中发现的，日本学者佐藤道夫也以大量的数据证实，10-HDA 分泌于工蜂的上颚腺。由于 10-HDA 是蜂王浆中特有的一种不饱和脂肪酸，所以 10-HDA 又称蜂王酸或王浆酸，并且一直以来被作为衡量蜂王浆质量及辨别其真伪的重要指标。常温时，10-HDA 为白色晶体，性质稳定，在室温或高温下长时间存放，结构也不会被破坏。目前已有多种方法可以从蜂王浆中分离提取出 10-HDA，也可进行人工合成。现代研究表明 10-HDA 具有抗菌、灭菌[1]、强壮机体、抑制小鼠白血病和腹水癌功能[2]、延长患癌动物的生存期[3]、治疗急性辐射损伤[4]和化学物质所致损伤等多种生理活性。并且也有报道，在拌刀豆蛋白 A 刺激下，10-HDA 能促进淋巴细胞增值。但是，有关 10-HDA 对细菌基因组的影响的研究鲜有报道。

目前已知的抑菌剂的作用途径较多，一般认为膜攻击理论是常用抑菌剂的最主要作用途径[5~6]，也有抑制细胞呼吸、阻碍细胞分裂、影响胞内蛋白质合成等方面的报道。而对于 10-HDA 的抑菌性能以及其具体

收稿日期：2013-04-16
基金项目：国家自然科学基金（31171727）；青年基金（31201281）
作者简介：王瑞明（1962-），男，博士，教授，研究方向：微生物酶技术，细胞催化技术

作用途径并无明确的研究报道。本文以大肠杆菌（*Escherichia colli*）、金黄色葡萄球菌（*Staphyloccocus aureus*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、沙门氏菌（*Salmonella*）、绿脓假单胞菌（*Pesudomonas pyocyaneum*）、藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）、白色念珠菌（*Monilia albican*）以及酿酒酵母（*Saccharomycescerevisiae*）为实验对象，明确 10-HDA 对常见细菌及真菌的抑制性能。同时，以枯草芽孢杆菌为模型，研究 10-HDA 发挥抑菌效果的作用机制，为进一步探索 10-HDA 应用于保健、药品等领域提供参考，同时为多途径开发利用蜂王浆提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与培养基

大肠杆菌（*Escherichia colli*），金黄色葡萄球菌（*Staphyloccocus aureus*），枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），沙门氏菌（*Salmonella*），绿脓假单胞菌（*Pesudomonas pyocyaneum*），藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*），白色念珠菌（*Monilia albican*），酿酒酵母（*Saccharomycescerevisiae*），以上菌种均由本实验室提供；LB 液体培养基（%）牛肉膏 0.5，蛋白胨 1.0，NaCl 0.5，pH 7.2；YEPD 培养基（%）：酵母膏 1.0，蛋白胨 2.0，葡萄糖 2.0。

1.1.2 主要仪器设备

DYY-12 电泳仪（北京市六一仪器厂）；ChampGel5500 凝胶成像系统（北京赛智创业科技有限公司）；柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒（大连宝生物工程公司）；PCR 所用引物（生工生物工程有限公司，上海）；原子力显微镜（德国 Bruker 公司）。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 菌株的培养条件

抑菌作用研究中所有条件均为菌体生长的最适条件，即细菌均采用 LB 培养基；真菌均采用 YEPD 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化

菌种经液体培养基培养过夜，取菌液进行平板划线培养，挑取生长状况较好的单菌落进行液体培养基扩增。

1.2.2 抑菌性能的测定

采用牛津杯法，在培养皿中倒入营养琼脂培养基，待凝固后，在其上均匀放 5 个无菌牛津杯[直径（7.8±0.1）mm]，然后将灭菌培养基冷却至 50~60 ℃，加入待测菌液 1 mL（菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL），迅速摇匀后，倒入上述培养皿，冷却后将牛津杯取出，作为抑菌活性检测平板。配制梯度浓度的 10-HDA 溶液（以二甲基亚砜，即 DMSO 作为溶剂），吸取 100 μL 加入到检测平板圈孔内，每种做 3 个平行试验。放在 37 ℃培养 24 h 后，用游标卡尺测量抑菌圈直径，计算平均值，进行对比研究。

1.2.3 最小抑菌浓度（MIC）的测定

液体倍半稀释法：用二甲基亚砜配制 10-HDA 倍比稀释液，浓度依次为 5.0 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.62 mg/mL、0.31 mg/mL 0.16 mg/mL，同时设空白对照组（DMSO 对照组）。取对数生长期的枯草芽孢杆菌培养液稀释使其浓度为 1×10^7 CFU/mL，分别加入以上稀释后含不同质量浓度 10-HDA 溶液，于 37 ℃、180 r/min 培养 18~24 h 后涂布平板，观察枯草芽孢杆菌的生长情况。枯草芽孢杆菌不生长的最小稀释浓度的 10-HDA 质量浓度即为最小抑菌浓度 MIC。

1.2.4 10-HDA 与细菌 DNA 结合凝胶阻滞实验

将培养至对数生长期的枯草芽孢杆菌收集，柱式抽提试剂盒提取基因组 DNA，紫外分光光度计检测 $OD_{260/280}$=1.89>1.8，符合实验要求。二甲基亚砜溶解 10-HDA，并作梯度稀释。在 1.5 mL 的 EP 管中加入 5 μL DNA 溶液，再分别加入 5 μL 经梯度稀释的 10-HDA 溶液，使其终浓度分别为 0 mg/mL、0.62 mg/mL、1.25 mg/mL、2.5 mg/mL、5.0 mg/mL、10.0 mg/mL，空白对照组为二甲基亚砜溶液。室温下孵育 10 min 后，进行 1%的 DNA 琼脂糖凝胶电泳，并用凝胶成像系统观察记录结果。

1.2.5 原子力显微镜观察 10-HDA 与 DNA 的结合

50 μg/mL 的枯草芽孢杆菌基因组 DNA 溶液中加入 10-HDA 溶液，使其终浓度为 1×MIC(即处理液中 10-HDA 的终浓度为 0.62 mg/mL)，同时设置空白对照组，室温孵育 10 min。将 10-HDA 与 DNA 复合物 10 μL 滴加到新鲜剥离的裸云母片表面，倾斜 45 度，让液滴流过整个云母片，37 ℃下静置 10 min。干燥后将制备的样品置于原子力显微镜扫描台上成像观察。

1.2.6 10-HDA 对细菌体内 DNA 含量的影响

将培养至对数生长后期的待测枯草芽孢杆菌进行离心收集，用新鲜的 LB 培养基稀释成为 1×10^7 CFU/mL，分别加入 10-HDA 稀释液，使其终浓度为 1×MIC（即菌液中 10-HDA 的终浓度为 0.62 mg/mL），同时设置空白对照组。37 ℃作用不同时间后离心收

集。按照柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书，提取基因组 DNA，进行 1%的 DNA 琼脂糖凝胶电泳，并用凝胶成像系统观察记录结果。

1.2.7 10-HDA 对 PCR 反应的影响

PCR 反应体系总体积为 20 μL：0.5 μL Taq 酶、0.2 μL 引物Ⅰ、0.2 μL 引物Ⅱ、2.5 μL dNTP、1.0 μL 模板（枯草芽孢杆菌基因组片段），加入不同浓度的 10-HDA 溶液，使其终浓度分别为 2.0 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL，最后用 ddH_2O 补足体系至 20 μL。每个浓度均设平行实验，同时设置空白对照组。PCR 扩增程序为预变性 95 ℃，5’；变性 95 ℃，30”；退火 54 ℃，30”；延伸 72℃，2’30”；继续延伸 72 ℃，10’，其中第 2-4 步循环 30 次。用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析，使用凝胶成像仪观察，并采集电泳照片。

2 结果与讨论

2.1 10-HDA 抑菌性能测定结果

本文采用牛津杯法分别测定了不同浓度的 10-HDA 对大肠杆菌，金黄色葡萄球菌，枯草芽孢杆菌，沙门氏菌，绿脓假单胞菌，藤黄微球菌，白色念珠菌，酿酒酵母的抗菌能力。如表 1 所示，10-HDA 对原核细菌类均有抑菌性，且抑菌效果较好，具有广谱抑菌性。而对于白色念珠菌、酿酒酵母则无抑菌圈出现，表明对其抑制效果不明显或无抑制性。

表 1 10-HDA 对不同微生物的抑菌作用

Table 1 Antibacterial activity of 10-HDA against different microorganisms

菌种	浓度/(mg/mL)				
	0	2.5	5.0	10.0	20.0
绿脓假单胞菌	-	+++	+++	++++	++++
沙门氏菌	-	++++	++++	++++	++++
藤黄微球菌	-	++++	++++	++++	++++
枯草芽孢杆菌	-	+++	++++	++++	++++
大肠杆菌	-	++	++	+++	++++
金黄色葡萄球菌	-	+++	++++	++++	++++
白色念球菌	-	-	-	-	-
酿酒酵母	-	-	-	-	-

注：抑菌直径≥20 mm 为极敏感“++++”；15 mm≤抑菌直径<20 mm 为高敏“+++”；10 mm≤抑菌直径<15 mm 为中敏“++”；7.8 mm≤抑菌直径<10 mm 为低敏“+”；抑菌直径<7.8mm 为无效“-”[7]。

2.2 最小抑菌浓度（MIC）的测定结果

表 2 10-HDA 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度

Table 2 MIC of 10-HDA to *Bacillus subtilis*

10-HDA 浓度/(mg/mL)	5.0	2.5	1.25	0.62	0.31	0.16
枯草芽孢杆菌生长	-	-	-	-	+	++

注：++表示菌体多；+表示菌体较少；—表示无菌生长[8]。

由表 2 结果可知，10-HDA 对枯草芽孢杆菌的生长具有很好的抑制作用，当 10-HDA 的质量浓度为 0.62 mg/mL 时枯草芽孢杆菌不生长，而当 10-HDA 浓度为 0.31 mg/mL 时枯草芽孢杆菌生长，因此，10-HDA 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度（MIC）为 0.62 mg/mL。

2.3 10-HDA 与细菌 DNA 结合凝胶阻滞实验

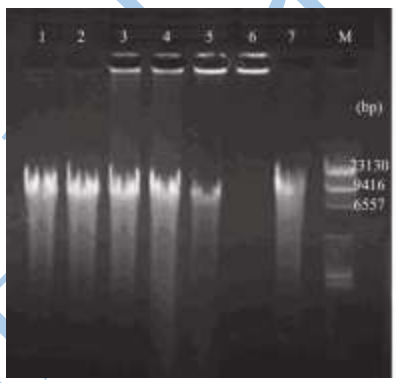


图 1 10-HDA 结合凝胶阻滞电泳图

Fig.1 Gel retardation assay of binding of DNA to 10-HDA

注：1~6 号泳道 10-HDA 浓度分别为：0 mg/mL；0.62 mg/mL；1.25 mg/mL；2.5 mg/mL；5.0 mg/mL；10.0 mg/mL，7 号泳道：无菌水对照组。

提取对数期的枯草芽孢杆菌的基因组与 10-HDA 室温条件下孵育一定时间，进行 1%琼脂糖凝胶电泳，如图 1 所示。我们发现，随着 10-HDA 浓度的增加，DNA 条带的亮度依次减弱，而留存在点样孔中的 DNA 量显著增加。这就说明 10-HDA 能够与细菌基因组 DNA 进行结合，进而导致其迁移率发生变化。10-HDA 对细菌基因组迁移率的影响可以直观地表现出 10-HDA 与基因组 DNA 有很强烈的相互结合，且这种结合作用与混合液中 10-HDA 的浓度有关。在 1.25 mg/mL（图 1 中 3 号泳道）时，开始有部分基因组 DNA 因为与 10-HDA 的结合，迁移率改变而无法跑出点样孔。当 10-HDA 浓度达到 10.0 mg/mL（图 1 中 6 号泳道）时，10-HDA 与 DNA 的强烈结合使其完全留在点样孔中。

2.4 原子力显微镜观察 10-HDA 与 DNA 的结合

我们采用原子力显微镜（Atomic Force Microscope，AFM）技术，进一步观察并分析 10-HDA 与 DNA 的相互作用，如图 2 所示。对照组是未加 10-HDA 的 DNA 分子，白色的长链状物即为 DNA 分子，它舒展分布，并无蜷曲。而在实验组图中是加入终浓度为 0.62 mg/mL 的 10-HDA 后的 DNA 分子。在实验组图中蜷曲的链状物即为 DNA 链，图中的小亮点为 10-HDA 颗粒，可以清楚地看到图中有 DNA 链上有很多的小亮点，形成串珠状复合物，由于 DNA 链上吸附了太多的 10-HDA 颗粒，甚至形成突起很高的山脊（白色突起链），而该探针无法扫描到深谷中，因此无法看到 DNA 链，只能看到明亮的突起物，但顺着这些突起的小亮点，就是一条 DNA 链。这个结果也从侧面反映了 10-HDA 能与 DNA 的结合能力很强。

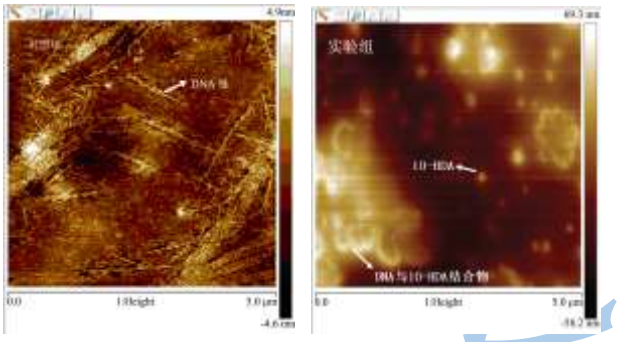


图 2 10-HDA 与细菌 DNA 结合的原子力显微镜观察

Fig.2 AFM image of *Bacillus subtilis* genomic DNA with 10-HDA

2.5 10-HDA 对细菌体内 DNA 合成的影响

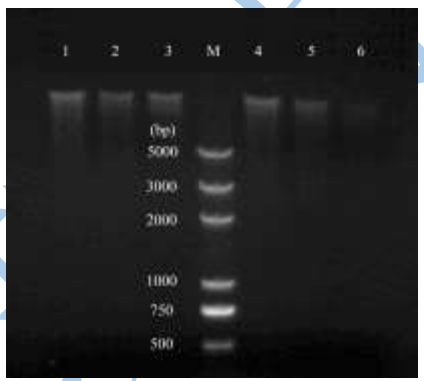


图 3 10-HDA 与细菌作用后基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of DNA from bacterial cells treated by 10-HDA

注：泳道 M：Marker；泳道 1、2、3：二甲基亚砜分别处理 90 min、30 min、10 min；泳道 4、5、6：10-HDA 分别处理 10 min、30 min、90 min。

如图 3 所示。我们发现经过 0.62 mg/mL 浓度的 10-HDA 处理过的实验组（图 3 中 4 号、5 号、6 号泳道）与 DMSO 溶剂空白对照组（图 3 中 1 号、2 号、3 号泳道）相比，随着 10-HDA 作用时间的延长，实验组的细菌基因组 DNA 条带（图 3 中 4 号、5 号、6 号泳道）亮度逐渐减弱，表明细菌 DNA 的合成量不断减少。

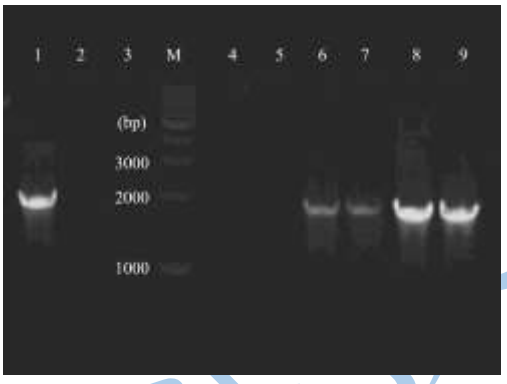


图 4 10-HDA 抑制 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of 10-HDA inhibited the generation of PCR products

注：泳道 M：Marker；泳道 1：对照组；PCR 反应体系中 10-HDA 的终浓度分别为：泳道 2、3：2.0mg/mL；泳道 4、5：1.0 mg/mL；泳道 6、7：0.5 mg/mL；泳道 8、9：0.25 mg/mL。

为了进一步确定 10-HDA 对菌体基因组 DNA 合成的影响，我们在 PCR 反应体系中加入不同浓度的 10-HDA 溶液后观察 PCR 扩增效果。如图 4 所示，在相同的 PCR 反应体系中，加入不同的量的 10-HDA，然后将扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。实验结果表明随着加入 10-HDA 浓度的增加，PCR 反应后基因组 DNA 条带的亮度明显减弱，这就说明因为 PCR 反应体系中 10-HDA 的加入使得细菌基因组 DNA 的 PCR 扩增受到抑制，导致扩增产物显著减少。当 10-HDA 浓度达到 0.5 mg/mL（图 4 中 6 号、7 号泳道）时，扩增产物条带已明显变淡，表明细菌基因组 DNA 的扩增已有明显抑制。当 10-HDA 浓度达到 1.0 mg/mL（图 4 中 4 号、5 号泳道）时，图 4 中 4 号、5 号泳道已无条带显示，表明该浓度的 10-HDA 已完全抑制了基因组 DNA 的 PCR 扩增，而 10-HDA 的溶剂二甲基亚砜对 PCR 无明显作用（图 4 中 1 号泳道）。分析其原因可能是 10-HDA 与 DNA 的结合使 DNA 聚合酶不能够正确识别 DNA 模板，进而阻止了 DNA 的复制合成。

3 结论

3.1 抑菌性能测定实验结果显示 10-HDA 对白色念珠菌、酿酒酵母没有抑菌圈，表明 10-HDA 对其无抑制或抑制效果不明显。对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、绿脓假单胞菌和藤黄微球

菌具有明显的抑制作用。结论认为，10-HDA 有很好的抑菌广谱性，同时对酿酒酵母等真核生物没有杀灭作用，说明10-HDA在天然产物抑菌剂开发方面前景广阔。本研究以枯草芽孢杆菌作为研究对象，测定其最小抑菌质量浓度为0.62 mg/mL。

3.2 有研究表明某些抑菌剂可与细菌染色体 DNA 发生相互作用，进而导致 DNA 的复制、转录、表达功能受抑制[9,10]。本研究结果表明，细菌经 10-HDA 作用后，随着处理时间的延长，菌体 DNA 的合成量减少。凝胶阻滞实验及 PCR 影响实验表明 10-HDA 能够与细菌基因组 DNA 结合，进而阻滞 DNA 的复制，进一步使得 DNA 的合成量减少，进而达到抑菌的效果[11]。

参考文献

[1] Bonvehi JS, Jorda RE. Organic acids influence on the microbiological quality and bacteriostatic activity of royal jelly [J]. Deut Lebensm-rundsch, 1991, 87(8): 256-259

[2] 苏松坤,沈飞英,戎映君,等.蜂王浆中活性组分的研究[J].中国养蜂,2005,56(8):65-67
Su S K, Shen F Y, Rong Y J. Research on the Functional Compositions in Royal Jelly [J]. Apiculture of China, 2005, 56(8): 65-67

[3] 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]. Annu Rev Bioph Chem, 2003, 104(1): 37-43

[4] 苏冠芳,郝刚,李莉蓉,等.抗菌肽 buforin Ⅱ衍生物抑制细菌核酸合成的机制研究[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):190-195
Su G F, Hao G, Li L R, et al. Antibacterial peptides buforin II analogues on bacteria by inhibition of DNA synthesis [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(3): 190-195

[5] Yanping Xie, Yiping He, Peter L. Irwin, et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2325-2331

[6] Mariachiara C, Francesco A, Laura F, et al. Antimicrobial Activity of Various Cationic Molecules on Foodborne [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23: 1679-1683

[7] 蓝蔚青,谢晶,侯伟峰,等.复合生物保鲜剂对松鼠葡萄球菌的抑菌性能及其作用机理研究[J].天然产物研究与开发,2012,24:741-746
Lan W Q, Xie j, Hou W F, et al. Antimicrobial Activity and Mechanism of Complex Biological Fresh-keeping Agents against Staphylococcus sciuri [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 741-746

[8] 胡静,赵小慧,朱春玉,等.槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理[J].食品科学,2012,33(5):33-36
Hu J, Zhao X H, Zhu C Y, et al. Inhibitory Effect and Mechanisms of Sophorolipids against *Staphyloccocus aureus* [J]. Food Science, 2012, 33(5): 33-36

[9] Kanyshkova TG, Semenov DV, Buneva VN, et a1. Human milk laetoferrin binds two DNA molecules with different affinities [J]. FEBS LETT, 1999, 451:235-237

[10] 宫霞,施用晖,乐国伟.抗菌活性肽与细菌染色体 DNA 的相互作用机理[J].自然科学进展,2004,14(5):509-514

[11] Ke Xing, Xi Guang, Chen, Cheng Sheng Liu, et al. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Eschenrichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132: 127-133