

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

文章编号: 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-dependent 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 1.0 mg/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

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

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

作用途径并无明确的研究报道。本文以大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas pyocyaneum*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、白色念珠菌 (*Monilia albican*) 以及酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 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 coli*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 沙门氏菌 (*Salmonella*), 绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas pyocyaneum*), 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*), 白色念珠菌 (*Monilia albican*), 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 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 °C,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 μ L 加入到检测平板圈孔内,每种做 3 个平行试验。放在 37 °C 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 °C、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 μ L DNA 溶液,再分别加入 5 μ L 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 μ g/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 $1\times MIC$ (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 μ L 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 °C 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 $1\times MIC$ (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 °C 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 μ L: 0.5 μ L Taq 酶、0.2 μ L 引物 I、0.2 μ L 引物 II、2.5 μ L dNTP、1.0 μ L 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 ddH₂O 补足体系至 20 μ L。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 $^{\circ}$ C, 5'; 变性 95 $^{\circ}$ C, 30"; 退火 54 $^{\circ}$ C, 30"; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 2'30"; 继续延伸 72 $^{\circ}$ C, 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

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	-	+++	++++	++++	++++
白色念珠菌	-	-	-	-	-
酿酒酵母	-	-	-	-	-

注: 抑菌直径 \geq 20 mm 为极敏感“++++”; 15 mm \leq 抑菌直径 $<$ 20 mm 为高敏“+++”; 10 mm \leq 抑菌直径 $<$ 15 mm 为中敏“++”; 7.8 mm \leq 抑菌直径 $<$ 10 mm 为低敏“+”; 抑菌直径 $<$ 7.8 mm 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

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。

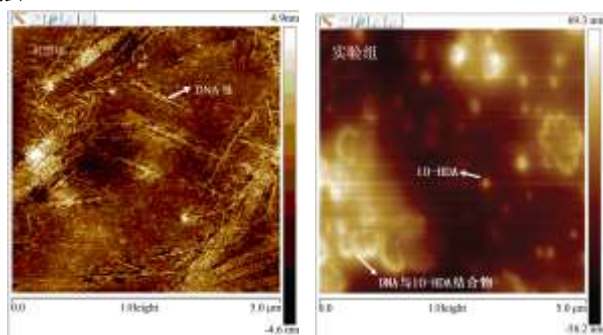


图 2 10-HDA 与细菌 DNA 结合的原子力显微镜观察

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

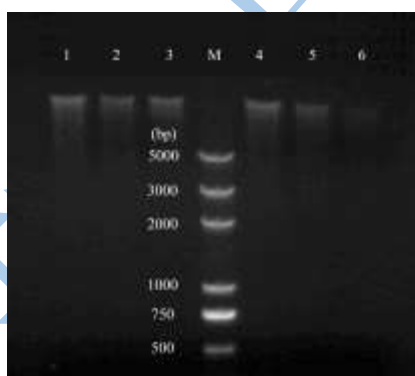


图 3 10-HDA 与细菌作用后基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

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

注: 泳道 M: Marker; 泳道 1、2、3: 二甲基亚砷分别处理 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。

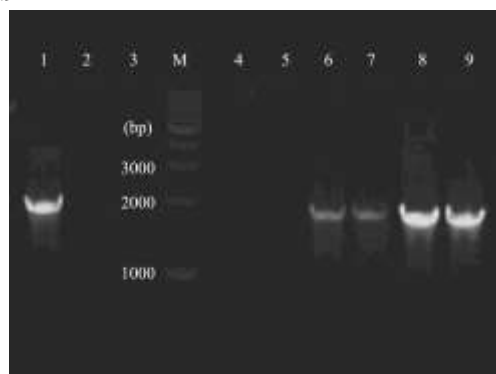


图 4 10-HDA 抑制 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果

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 的溶剂二甲基亚砷对 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 *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science, 2012, 33(5): 33-36
- [9] Kanyshkova TG, Semenov DV, Buneva VN, et al. Human milk lactoferrin 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 *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132: 127-133