

内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对大肠杆菌抑菌机制的研究

王永刚^{1,4}, 杨光瑞¹, 马雪青², 王鸣刚¹, 冷非凡¹, 王帆³, 马建忠¹, 陈吉祥^{4*}

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046

3. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

4. 兰州理工大学能源与动力工程学院, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 研究分离自药用植物白毛蛇 *Humata tyermanni* 的内生真菌链格孢菌发酵产物醋酸乙酯提取物 (B06_e) 对大肠杆菌的抑菌机制。方法 采用倍比稀释法测定了 B06_e 对大肠杆菌的最低抑菌浓度 (MIC); 测定了 B06_e 作用前后大肠杆菌培养液电导率、核酸和蛋白质的变化; 结合流式细胞仪、扫描电子显微镜、凝胶阻滞实验、圆二色谱和荧光实时定量 PCR 的分析方法研究了 B06_e 对大肠杆菌细胞膜结构、形态、DNA 的影响。结果 B06_e 对大肠杆菌的 MIC 为 25 μg/mL, 3×MIC 处理组的电导率是对照组的 1.01 倍; 3×MIC 处理组的 β-半乳糖苷酶活性是对照组的 11.6 倍; 流式细胞仪分析表明 3×MIC 处理组被碘化丙啶 (PI) 染色的阳性细胞比是对照组的 286.5 倍; 扫描电子显微镜结果显示, B06_e 处理后菌体表面变得粗糙, 细胞膜大量塌陷; 以上结果说明 B06_e 能增大细胞膜的通透性, 破坏细胞膜的完整性。凝胶阻滞、圆二色谱的结果表明, B06_e 能够以嵌插的方式与 DNA 结合, 但不能降解 DNA; 实时定量 PCR 结果表明, 经 B06_e 处理后 *recA* 和 *recN* 基因的表达量分别是对照组的 2.9 和 3.7 倍, 说明 B06_e 能破坏 DNA 的结构, 迫使大肠杆菌启动了 SOS 修复。结论 B06_e 通过破坏大肠杆菌细胞膜完整性和 DNA 的结构, 使得细菌代谢紊乱, 最终导致细菌丧失了生长繁殖的能力。

关键词: 大肠杆菌; 白毛蛇; 内生真菌; 链格孢菌; 抗菌机制; 细胞膜通透性; 细胞膜结构; DNA 损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)02-0374-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.017

Antibacterial mechanisms of endophytic fungi *Alternaria alternata* of ethyl acetate extract on *Escherichia coli*

WANG Yong-gang^{1,4}, YANG Guang-rui¹, MA Xue-qing², WANG Ming-gang¹, LENG Fei-fan¹, WANG Fan³, MA Jian-zhong¹, CHEN Ji-xiang⁴

1. Lanzhou University of Technology, School of Life Science and Engineering, Lanzhou 730050, China

2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

3. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China

4. Lanzhou University of Technology, School of Petrochemical Engineering, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To study the antibacterial mechanisms of ethyl acetate extract (B06_e) from the fermentation liquid of an endophytic fungus *Alternaria* spp. *Alternaria* spp isolated from the medicinal plant *Humata tyermanni*. **Methods** Double dilution method was adopted to measure the minimum inhibitory concentration (MIC) of B06_e against *Escherichia coli*. Then, the changes of electric conductivity of bacterial culture, nucleic acid and protein concentration before and after treated by B06_e were analysed, respectively. Besides, flow cytometry, scanning electron microscopy, gel retardation experiments, circular dichroism spectrum and Real-time quantitative PCR were introduced to study the antimicrobial mechanisms of B06_e against *E. coli*. **Results** The results showed that MIC value of B06_e against *E. coli* was 25 μg/mL. The electric conductivity of 3 × MIC treatment group was 1.01 times the value of the control group. The β-galactosidase activity of 3 × MIC treatment group was 11.6 times more than the value of the control

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31460032, 81660581)

作者简介: 王永刚 (1983—), 男, 博士, 研究方向为微生物基因工程与环境工程。E-mail: 412316788@163.com

*通信作者 陈吉祥 E-mail: chenjixiang@lut.cn

group. Flow cytometry analysis showed that PI positive cells ratio of $3 \times \text{MIC}$ treatment group was 286.5 times the value of the control group. Scanning electron microscopy showed that cell surface becomes rough after the treatment of B06_e, a large number of cell membrane collapse. These results suggested that B06_e can increase the permeability of cell membrane, destroy the integrity of cell membrane. The results of gel retardation experiments and circular dichroism spectrum applied that B06_e can be inserted into DNA structure at particular position, however, can not cause DNA degradation. Real-time quantitative PCR results showed that the expressions of *recA* and *recN* genes were both up-regulated with the values of 2.9 and 3.7 times the value of the control group, respectively. This result suggested that B06_e can destroy the DNA structure, which force *E. coli* to initiate SOS repair. **Conclusion** B06_e can kill *E. coli* cell by destroying the cell membrane and damaging DNA structure.

Key words: *Escherichia coli*; *Humata tyermanni*; endophytic fungus; *Alternaria* spp.; antibacterial mechanism; cell membrane permeability; cell membrane structure; DNA damage

植物内生真菌指那些长期定殖于健康植物组织和器官中,而不使宿主表现出明显感染症状的一类真菌^[1-2]。已有研究结果表明,内生真菌具有产生与宿主植物相同或相似化学组分的能力^[3],国内外许多科学家已经从多种药用植物内生真菌发酵产物中发现了具有抗菌、抗氧化、抗癌和抗肿瘤的活性物质^[1-3]。近年来,由于抗生素的滥用,对传统的抗生素有抗性的病菌陆续被报道,如携带 MCR-1 基因的大肠杆菌,对多达 15 种抗生素有抗性^[4]。耐药性病菌的出现使人们意识到新型抗菌素的开发已迫在眉睫。而内生真菌能产生抗菌活性物质,已成为人们获取新型抗菌药物的新资源^[5-6]。

关于内生真菌发酵产物提取物抑菌作用的报道越来越多,大都停留在新化合物的分离和鉴定,抑菌机制的研究尚处于初级阶段,缺乏系统的有关内生真菌代谢产物抑菌机制的研究报道。多年来,本课题组立足于甘肃省道地药材,先后从当归、甘草、白毛蛇等多种药用植物中分离获得 150 株内生真菌,并对各菌株的发酵产物活性进行了分析,筛选获得了多株具有较好抗氧化、抑菌、抗肿瘤活性的菌株^[7]。其中,从白毛蛇 *Humata tyermanni* Moore 根部组织中分离到的内生真菌链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, 其发酵液醋酸乙酯提取物 (B06_e) 对革兰阴性的大肠杆菌具有较强的抑制作用^[8]。因此,本研究就其抑菌机制从细胞水平和分子水平进行系统研究,旨在较为系统地研究 B06_e 对大肠杆菌菌体细胞膜及基因调控的影响,以期为内生真菌次级代谢产物在抗菌活性物质的筛选和研究中提供基础的理论依据。

1 材料

1.1 菌株

大肠杆菌 CMCC (B) 44102、链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 菌株为本实验室保藏

菌种^[8]。

1.2 主要试剂

二甲基亚砜 (DMSO), 上海中泰化学试剂有限公司; 邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 碘化丙啶 (PI), Sigma-Aldrich Co.; 高纯度总 RNA 提取试剂盒, BioTeKe; PrimeScriptTM Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), TaKaRa; SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus), TaKaRa。

1.3 主要仪器

UV-5200 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; FE30 Plus 电导率仪, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; BD LSRFortessaTM Cell 流式细胞仪, BD Biosciences 公司; JSM-6701F 型冷场发射型扫描电镜, 日本电子光学公司; Olis DSM1000 双光束圆二色谱, 美国 Olis 公司; Nexus 670 FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; Real-Time PCR 仪 (StepOnePlusTM Real-Time PCR System), Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 B06_e 的提取

在无菌条件下从链格孢菌菌株平板上挑取单菌落, 接种于 2.5 mL PDB 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 振荡培养 5 d, 再按照 2.0% 接种量接种于 250 mL PDB 液体发酵培养基中, 相同条件下振荡培养 14 d。发酵结束后, 将发酵液用布氏漏斗抽滤, 将滤液用等体积的醋酸乙酯进行萃取, 萃取 3 次, 合并萃取液。减压浓缩后自然风干成浸膏, 得到 B06_e。用 DMSO 将 B06_e 配制成 1 mg/mL 母液, 于 4 °C 保存, 备用^[9]。

2.2 最小抑菌浓度 (MIC) 与最小杀菌浓度 (MBC) 的测定

参照 Domröse 等方法^[10], 稍作改进。取 6 支含

4.4 mL LB 液体培养基的试管,均接种 500 μL 生长至对数期的大肠杆菌悬液 (1×10^8 CFU/mL),再依次向每支试管中加入 100 μL 不同质量浓度的 B06_e 溶液,使 B06_e 的终质量浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$,充分混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养。12 h 后观察,有细菌生长的试管培养液会变浑浊,以培养液变浑浊的前 1 试管的 B06_e 稀释质量浓度认定为 MIC。吸取 100 μL 未变浑浊的试管培养液,均匀涂布于 LB 固体平板培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h,以无菌生长的 B06_e 最小稀释质量浓度认定为 MBC,用无菌水和 DMSO 代替 B06_e 溶液作为对照组,每个质量浓度设 3 个平行。

2.3 菌液电导率的测定

参照钱丽红等^[11]的方法,将对数期大肠杆菌悬液用 0.85% NaCl 溶液洗涤 2 次,重悬至菌体浓度约为 1×10^8 CFU/mL,吸取 4.9 mL,分别与 100 μL 不同质量浓度的 B06_e 溶液混合,使其终质量浓度分别为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 和 $3 \times \text{MIC}$,以无菌水代替 B06_e 作为对照组,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养,分别在 0、1、2、4、6、8 h 取其上清液测定电导率,每个处理重复 3 次。

2.4 细胞内核酸、蛋白质泄漏的测定^[11]

菌液处理方法同“2.3”项,取各时间段的培养液,分别测定上清液在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 (A) 值,以无菌水代替 B06_e 溶液作为空白对照,每个处理重复 3 次。

2.5 β -半乳糖苷酶活性的测定^[12]

将已活化的大肠杆菌按 1:100 比例接种于 50 mL 含有 5% 乳糖的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养至对数期。用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 代替 0.85% NaCl 溶液,参照“2.3”项中所述方法,取 200 μL 各时间段的上清液与 800 μL 0.05 mol/L ONPG 混合,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 40 min 后,加入 1 mL 0.5 mol/L Na_2CO_3 终止反应。在 420 nm 处测定 A 值,设置无菌水对照组,实验重复 3 次。按以下公式计算 β -半乳糖苷酶活力单位 (U/mL) = $A_{420} \times 2.778$ 。

2.6 流式细胞仪分析^[13]

菌体处理部分与“2.3”项所述相同。培养后的菌体用无菌的 0.85% 的 NaCl 溶液洗涤 2 次,调整菌体浓度约为 1×10^8 CFU/mL。在处理后的菌液中

均加入终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ PI,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测。

2.7 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 检测 B06_e 对细菌细胞膜结构的影响^[14]

取对数期的大肠杆菌菌液,用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次,重新悬浮 (浓度调整为 1×10^8 CFU/mL)。取 50 mL 菌悬液,向其中加入终质量浓度为 $2 \times \text{MIC}$ 的 B06_e 溶液,用无菌水代替 B06_e 作为对照组,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 8 h。菌体用 PBS 冲洗 2 次后用 40 倍体积的 2.5% 戊二醛溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。依次用 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇溶液脱水,最后用叔丁醇置换乙醇 3 次,室温干燥。取少量样品粉末与 150 mg 干燥的 KBr 混合,于玛瑙研钵中研磨至粒径在 2.5 μm 以下,将研磨后的样品在压片机上压片。使用 FT-IR 光谱检测仪进行检测,检测方法为衰减全反射法。检测波数范围 4 000~500 cm^{-1} ,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 32 次。红外光谱采用 OMNIC 软件进行分析。

2.8 扫描电子显微镜 (SEM) 分析^[14]

采用“2.7”项方法,对大肠杆菌细胞进行固定化、脱水、干燥。镀膜后通过 SEM 观察。

2.9 B06_e 对大肠杆菌 DNA 的影响

B06_e 与 DNA 结合的凝胶阻滞分析根据 Imura 等^[15]报道的方法稍做改动。取 50 $\mu\text{g/mL}$ 的大肠杆菌基因组 DNA 10 μL ,分别与不同质量浓度 (终质量浓度依次为 0、0.635、1.040、2.080、4.160、8.320 mg/mL) 的 B06_e 溶液 2 μL 混合后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。取 5 μL 反应混合物与 1 μL 6 $\times$ loading buffer,在 0.8% 琼脂糖凝胶中,于 130 V 下恒压电泳 20 min,将胶片置于紫外灯下观察并记录。

2.10 圆二色谱 (CD) 检测 B06_e 对细菌基因组 DNA 结构的影响

取 500 $\mu\text{g/mL}$ 的大肠杆菌基因组 DNA 溶液 490 μL ,加入 10 μL 不同质量浓度的 B06_e,使其终质量浓度分别为 37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g/mL}$,混匀后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。用 MOS450 圆二色谱仪进行扫描。扫描范围为 220~320 nm,狭缝 2 nm,扫描速度为 10 nm/min,以 TE 缓冲液代替 B06_e 作为阴性对照。每个样品连续扫描 4 次,取平均值^[16]。

2.11 荧光实时定量 PCR 分析 B06_e 对细菌 DNA 的影响

取对数期的大肠杆菌菌液,用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次,重新悬浮 (浓度调整为 1×10^8 CFU/mL)。取 50 mL 菌悬液,向其中加入终质量浓

度为 $2 \times \text{MIC}$ 的 B06e 溶液, 用无菌水代替 B06e 作为对照组, 于 37°C 、 150 r/min 振荡培养 8 h 。培养后按照高纯度 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA。提取的总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳检测合格后, 按照 PrimeScriptTM Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂说明进行反转录。最后按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Perfect Real

Time) 试剂盒说明书, 在 Real-Time PCR 仪 (StepOnePlusTM Real-Time PCR System) 中进行实时定量分析。本研究采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 算法计算基因表达倍数, 实时定量引物序列见表 1。

2.12 数据统计分析

以上测定均为 3 组平行, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据图均利用 Origin Pro 8.0 处理完成。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 The prime of qRT-PCR

基因名称	基因描述	基因序列 (5'→3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$
recA	DNA 链交换和重组蛋白	上游引物 GTGCCACCATTTCCATCTC	55.85
		下游引物 TCCTACGCTACCGATTCTC	55.06
recN	重组和修复蛋白	上游引物 TCCGAAGTGTACCTTGTG	55.27
		下游引物 ATGATGATGCTGTGATAACG	55.89
16 S rRNA	16 S 核糖体 RNA	上游引物 CGGACGGGTGAGTAATGTCTG	56.43
		下游引物 AGGTCCCCCTCTTTGGTCTTG	57.14

3 结果与分析

3.1 B06e 对大肠杆菌的 MIC 和 MBC

由表 2 可知, B06e 对大肠杆菌的 MIC 和 MBC 均为 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$, 并且作为阴性对照的 DMSO 没有表现出任何抑菌作用, 表明其作为溶剂不会影响抑菌实验的结果。

表 2 B06e 对大肠杆菌的 MIC 和 MBC

Table 2 MIC and MBC of B06e against *E. coli*

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	MIC 实验	MBC 实验
无菌水	—	+	+
DMSO	—	+	+
B06e	200	—	—
	100	—	—
	50	—	—
	25	—	—
	12.5	+	+
	6.5	+	+

“+” 为有菌生长; “—” 为无菌生长

“+” bacterial growth; “—” no bacterial growth

3.2 B06e 对菌体细胞膜通透性的影响

3.2.1 菌液的电导率测定结果 如图 1 所示, 在 B06e 与大肠杆菌作用 $0\sim 2\text{ h}$, 反应液的电导率迅速增大; 在 $2\sim 6\text{ h}$ 时, B06e 终质量浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 的培养液电导率继续增大, 在 6 h 时达到最大 [$(10.580 \pm 0.051)\text{ mS/cm}$]。B06e 终质量浓度为 $2 \times \text{MIC}$ 和 $3 \times \text{MIC}$ 的培养液电导率在 2 h 之后基本不再增大, 最大值分别为 $(10.590 \pm 0.063)\text{ mS/cm}$ 和 $(10.650 \pm$

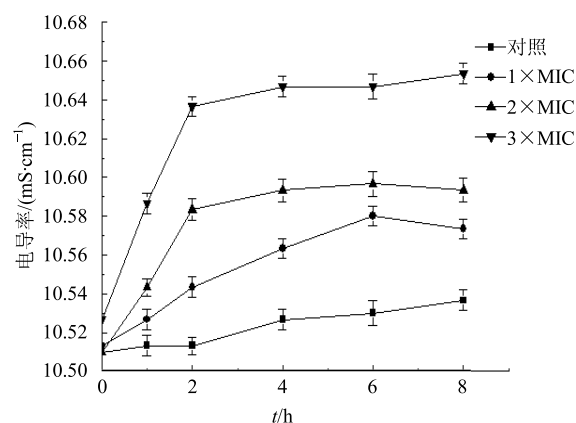
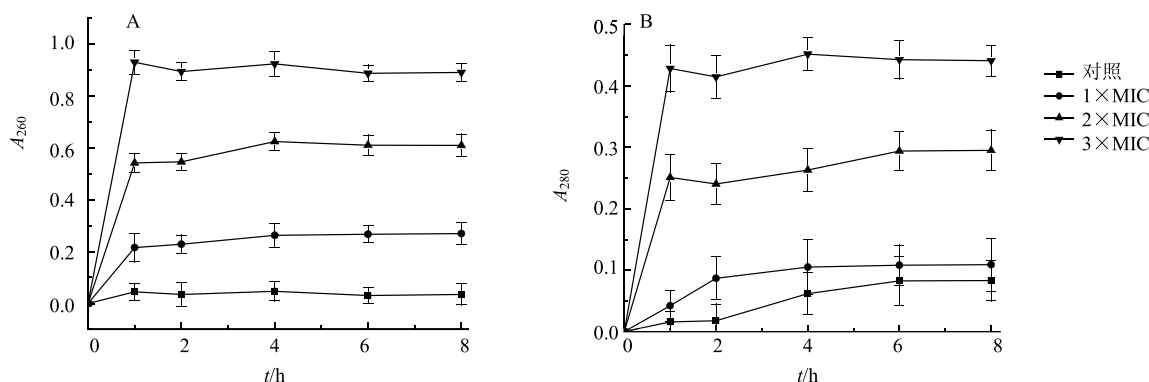


图 1 B06e 对大肠杆菌电导率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of B06e on electric conductivity of *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$0.052)\text{ mS/cm}$, 均高于无菌水对照组 [$(10.530 \pm 0.050)\text{ mS/cm}$]。而且, 从图 1 中可以看出菌液的电导率大小与 B06e 作用质量浓度呈正相关。对照组在后期电导率有所上升, 可能是由于菌体自溶所导致的。以上结果表明 B06e 与大肠杆菌作用后, 菌体细胞内电解质 (Na^+ 、 K^+ 、 H^+) 外漏至培养液中, 进一步说明 B06e 能使大肠杆菌细胞膜的通透性增大。而 Na^+ 、 K^+ 、 H^+ 等对于维持细胞膜结构及功能、酶活性、细胞代谢至关重要^[11], 这些离子的大量外漏必然会影响到细胞正常的生理活动。

3.2.2 B06e 对大肠杆菌核酸、蛋白质类物质泄漏量的影响 如图 2 所示, 大肠杆菌与 B06e 作用 $0\sim 0.5\text{ h}$, 培养液上清液在 260 、 280 nm 处的 A 值均迅速

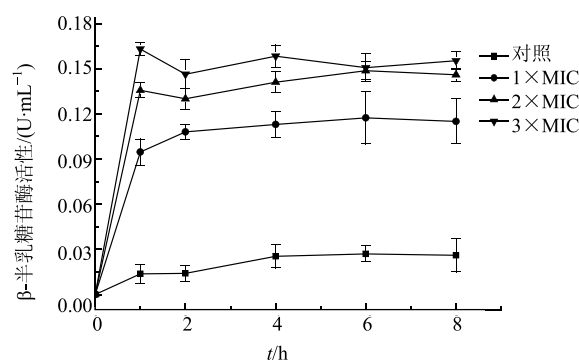
图 2 B06_e对大肠杆菌核酸 (A) 和蛋白质 (B) 泄漏的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Effect of B06_e on leakage of nucleic acid (A) and protein (B) out of *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

增加,此后 A 值增加幅度明显放缓,随着作用时间的延长, A 值基本不再增加。B06_e 处理组溶液的 A 值明显高于对照组,并且溶液的 A 值随着 B06_e 质量浓度的增大而增大。核酸、蛋白质类物质分别在 260 nm 和 280 nm 处有强吸收峰,在 0~0.5 h, A 值的增加表明在此时间段内培养液中核酸、蛋白质含量迅速增加;而正常情况下由于细胞膜的阻隔,核酸、蛋白质类大分子物质不会泄漏至胞外,因此说明 B06_e 破坏了大肠杆菌细胞膜结构。

3.2.3 β -半乳糖苷酶活性的测定结果 β -半乳糖苷酶是一种胞内酶,正常情况下不会泄漏至细胞外,只有当细胞膜通透性增大或细胞膜遭到破坏时,才会在胞外检测到^[12]。如图 3 所示,在 0~1 h,菌液中 β -半乳糖苷酶的含量快速增加,且 B06_e 质量浓度为 3×MIC 的菌液中 β -半乳糖苷酶的含量在 1 h 达到最大值,是对照组 [(0.0139 ± 0.0065) U/mL] 的 11.6 倍。在 1~2 h, B06_e 为 1×MIC 的菌液中 β -半乳糖苷酶的活性继续增加,但增加速率有所放缓,在 6 h 达到最大值,其值是对照组的 6.86 倍;而 B06_e 质量浓度为 2×MIC 作用的菌液中 β -半乳糖苷酶的含量有所下降;在 2~6 h, β -半乳糖苷酶的含量有所波动,但整体趋于稳定。以上结果表明, B06_e 作用于大肠杆菌细胞膜,极大地增加了内膜的通透性,或破坏了膜的完整性,才使得 β -半乳糖苷酶泄漏至胞外。

3.3 流式细胞仪分析细菌细胞膜的通透性

PI 是一种非通透性的核酸染料,只有当细胞膜通透性增大或完整性遭到破坏时,PI 才可以进入细胞内非特异性地与 DNA 结合,当其与 DNA 结合后,PI 的荧光强度会成倍增加^[17]。因此,可以通过流式

图 3 B06_e对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶泄漏的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effect of B06_e on leakage of β -galactosidase out of *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞计数法计算经 B06_e 处理前后被 PI 着染的细胞数来间接地反映 B06_e 对细菌细胞膜的损伤程度。

如图 4 所示,对照组被 PI 染色阳性细胞所占比例仅为 0.2%,经 1×MIC B06_e 处理后,阳性细胞比例上升至 5.1%,由于背景干扰,此时的阳性细胞比依然很低;但当 B06_e 为 2×MIC 时,被 PI 染色的阳性细胞数增加到了 41.2%,红染细胞数是对照组的 260 倍,是 1×MIC B06_e 处理组的 8.1 倍。当 B06_e 终质量浓度增大到 3×MIC 时,被 PI 着色的阳性细胞比例达到了 57.3%,是 2×MIC 处理组的 1.39 倍。以上结果表明 B06_e 极大地增加了大肠杆菌细胞膜的通透性,并且 B06_e 质量浓度越大,导致细胞膜的通透性也越大。

3.4 FT-IR 对细胞膜结构的研究

FT-IR 技术是一种广泛用于检测细菌细胞膜表面有机官能基团的方法^[18]。如图 5 所示,经 B06_e 处理前后,大肠杆菌 FT-IR 的变化较微弱,无法从原始的 FT-IR 图中分辨出峰位变化。为了解析

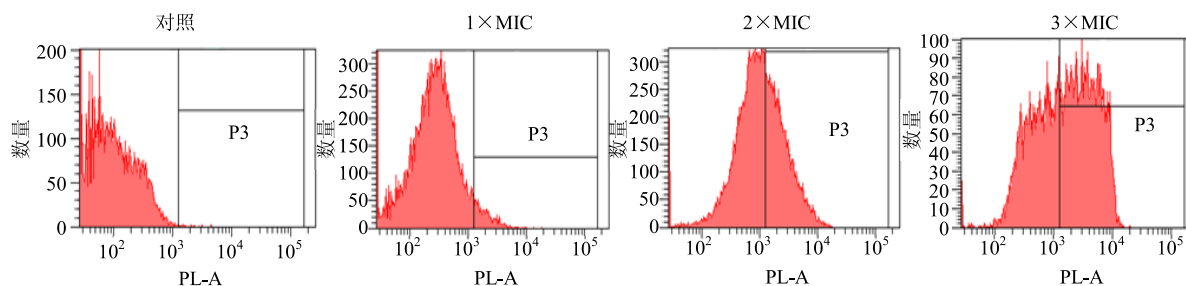


图 4 流式细胞仪分析

Fig. 4 Flow cytometry analysis

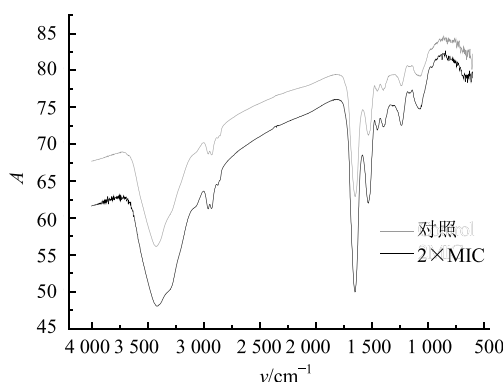


图 5 B06_e处理前后大肠杆菌 FT-IR 图

Fig. 5 FT-IR spectra of control group and B06_e-treated samples of *E. coli*

出原始图谱中包含的信息,通常需对原始图谱进行二阶导数和去卷积^[19]。从图 6 中可以看出,2 880~2 970 cm^{-1} 为 C-H 振动峰,经 B06_e 处理后,2 957 cm^{-1} 处的 CH_3 反对称伸缩振动吸收峰、2 919 cm^{-1} 处的 CH_2 反对称伸缩振动吸收峰和 2 872 cm^{-1} 处的 CH_3 对称伸缩振动的吸收峰发生了明显的变化。这些结果主要反映了细胞膜的变化,也进一步说明了经 B06_e 处理后大肠杆菌细胞膜结构发生了改变。

3.5 SEM 对大肠杆菌菌体显微形态的观察

SEM 直观地显示了 B06_e 对大肠杆菌菌体细胞的破坏作用。如图 7 所示,在对照组中,大肠杆菌菌体细胞形态完整、细胞表面平整、纹理规则。而经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2×MIC) B06_e 作用 8 h 后的大肠杆菌菌体表面变得粗糙,出现很多褶皱,细胞膜凹陷,边缘破损,形态完整性遭到了极大破坏。此结果表明 B06_e 能穿透菌体细胞壁,造成细胞膜破损。

3.6 B06_e 对大肠杆菌 DNA 的影响

3.6.1 B06_e 与 DNA 作用的凝胶阻滞分析 从图 8 中可以看出,随着 B06_e 质量浓度的增大, DNA 在电泳中的条带逐渐变暗,而且 DNA 在电泳过程中

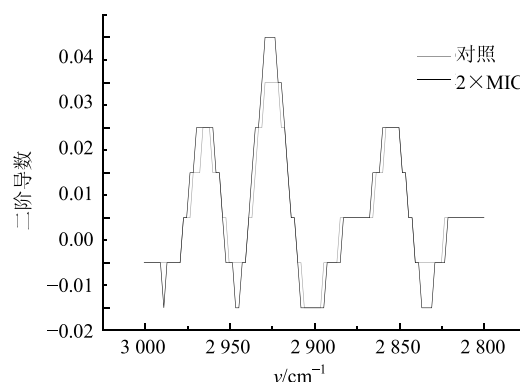


图 6 B06_e处理前后大肠杆菌 FT-IR 二阶导数图

Fig. 6 Second-derivative FT-IR spectra of control group and B06_e-treated samples of *E. coli*

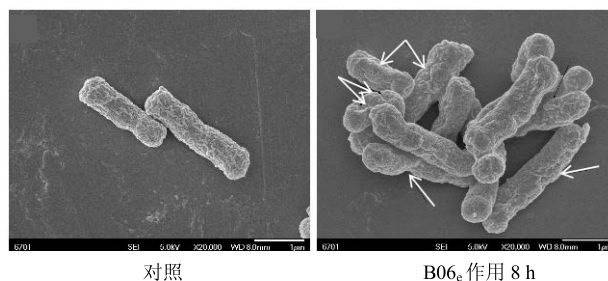
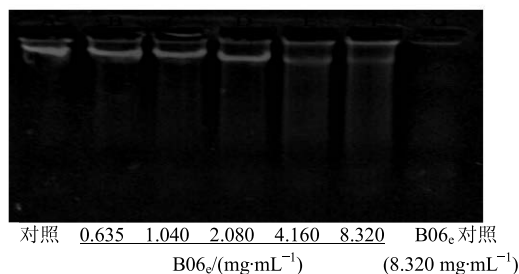
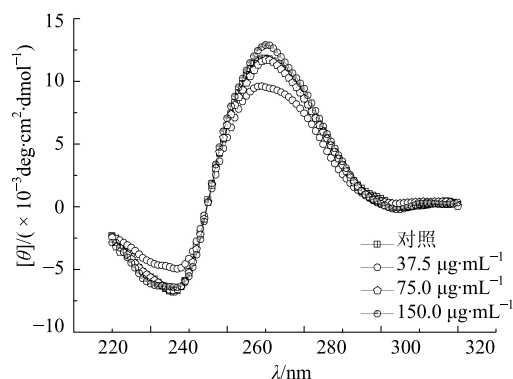


图 7 B06_e 对大肠杆菌菌体显微形态的影响 (×20 000)

Fig. 7 Effect of B06_e on morphology of *E. coli* (×20 000)

的迁移率也随之增大。此结果表明, B06_e 能够与大肠杆菌基因组 DNA 相互作用,进而影响 DNA 的结构,但从图 8 中并未观察到 DNA 断裂带,表明 B06_e 并不能使 DNA 链断裂,据此,可推断 B06_e 可以同溴化乙锭 (EtBr) 竞争性地与 DNA 结合而使得 DNA-EtBr 复合物的量减少,因而在紫外灯下几乎观察不到被 EtBr 染色的明亮条带。

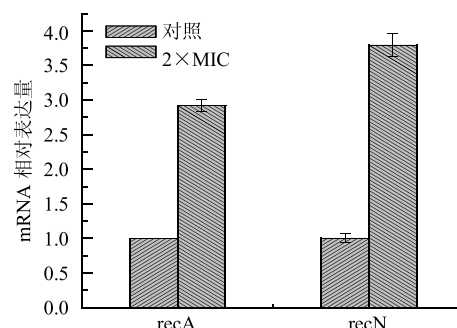
3.6.2 CD 分析 B06_e 对细菌基因组 DNA 结构的影响 CD 是研究 DNA 构象的重要手段,因而本研究利用 DNA 的 CD 方法研究 B06_e 与 DNA 作用后,其对 DNA 结构的影响。如图 9 所示,在 270 nm 处

图 8 B06_e 对大肠杆菌 DNA 的影响Fig. 8 Effect of B06_e on DNA of *E. coli*图 9 B06_e 对大肠杆菌 DNA 结构的影响Fig. 9 Effect of B06_e on DNA structure of *E. coli*

的正峰是由碱基的堆积作用产生的, 而 247 nm 的负峰则代表了 DNA 双螺旋结构的 B 型构象^[19]。当加入 B06_e 后, DNA 的正峰强度降低, 说明 DNA 的双螺旋结构在 B06_e 的作用下变得松散, 同时 B06_e 也减小了 DNA 碱基对之间的 π - π 堆积作用。从图 9 中可以看出, DNA 的 CD 谱峰位并未发生变化, 说明 B06_e 的加入只能影响 DNA 的二级结构, 并不能造成双螺旋的解链。CD 分析结果进一步证明了“3.6.1”中提出的推论, 即 B06_e 可以与 EtBr 竞争性结合 DNA。

3.7 B06_e 对细菌基因的影响

在细菌中, 当 DNA 受到严重损伤时, 细菌会启动 SOS 修复系统, *recA* 和 *recN* 基因迅速编码 RecA 蛋白和 RecN 蛋白对损伤的 DNA 链进行修复, 以保护细胞^[20]。通过 qRT-PCR 技术对与细菌 DNA 损伤修复相关的 *recA* 和 *recN* 基因的表达水平进行分析, 结果如图 10 所示, 与对照组相比, 经 B06_e 处理后大肠杆菌 *recA* 和 *recN* 基因的表达量分别上调了 5.27 倍和 2.92 倍。这表明 B06_e 进入大肠杆菌细胞后破坏了 DNA 的结构即引起 DNA 损伤。在 DNA 受到损伤的情况下, 细胞为了存活, 启动了 SOS 修复。以上结果表明 B06_e 的加入能造成 DNA

图 10 B06_e 对大肠杆菌 DNA 损伤修复相关基因表达的影响Fig. 10 Effect of B06_e on the expression of DNA damage repair related genes of *E. coli*

的损伤, 打破了细胞原有的基因表达调控, 造成代谢调控紊乱, 最终导致细胞死亡。

4 讨论

近年来, 随着人们对内生真菌的研究和开发, 尤其是意识到内生真菌次级代谢产物具有抗菌、抗癌、抗氧化等活性, 内生真菌已经成为人们寻找新的抗菌活性物质的巨大宝库^[21-22]。张慧茹等^[23]通过测定绞股蓝内生真菌 JY25 发酵液作用于细菌前后 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶活性、电导率和蛋白质含量的变化, 证明了是通过破坏细菌细胞膜和影响蛋白质合成而抑制细菌生长。Alpha 等^[24]用内生真菌 *Muscodor albus* (CZ-620) 产生的挥发性物质去处理 1 株 DNA 损伤修复酶缺陷的大肠杆菌突变株, 发现该挥发性物质能在 DNA 复制和转录过程中造成 DNA 断裂。因此, 本研究从细胞水平和分子水平分别研究了 B06_e 对大肠杆菌的抑制机制, 表明 B06_e 对大肠杆菌具有显著的抑制作用, 其 MIC 为 25 μ g/mL。主要是通过增加细胞膜通透性, 造成胞质内物质如 Na^+ 、 K^+ 、核酸、蛋白质等的渗漏, 而造成细胞的生理功能紊乱, 抑制了细胞的正常生长; 同时 B06_e 可与大肠杆菌基因组 DNA 作用, 影响细菌 DNA 的正常复制和相关基因的表达调控, 使得细胞代谢紊乱, 从而抑制细胞繁殖。然而 B06_e 中究竟是哪种或哪几种化合物在抑制大肠杆菌生长中起关键作用, 尚不清楚。目前正在对 B06_e 中单体化合物进行分离和鉴定工作, 后期拟进一步对分离获得的单体物质抑制大肠杆菌生长的分子机制进行研究, 为新抗菌素的筛选和开发提供基础。

参考文献

- [1] Ferreira M C, Vieira M L A, Zani C L, et al. Molecular

- phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 59: 36-44.
- [2] 陈丽媛, 孙翠焕. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 98-101.
- [3] 程玉鹏, 李天聪, 林进华, 等. 内生真菌与药用植物宿主间的交流 [J]. 中医药信息, 2016, 33(6): 120-122.
- [4] Huo T I. The first case of multidrug-resistant NDM-1-harboring Enterobacteriaceae in Taiwan: here comes the superbacteria! [J]. *J Chin Med Assoc*, 2010, 73(11): 557-558.
- [5] Wang W X, Kusari S, Laatsch H, et al. Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(4): 704-710.
- [6] 杨本寿, 苗翠苹, 张建华, 等. 飞龙斩血内生菌种群分布及抑菌活性检测 [J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 276-284.
- [7] 杨明俊, 李娟, 薛鸿燕, 等. 水仙内生真菌的分离及抑菌和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 819-824.
- [8] 王帆. 六种中药材内生真菌的分离纯化及其发酵产物活性研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016.
- [9] Amorim M R, Somensi A, Araujo A R, et al. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) [J]. *J Brazil Chem Soc*, 2016, 27(6): 1048-1054.
- [10] Domröse A, Klein A S, Hage-Hülsmann J, et al. Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida* [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6(3): 972-980.
- [11] 钱丽红, 陶妍, 谢晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理 [J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628-1633.
- [12] Mason D J, Power E G, Talsania H, et al. Antibacterial action of ciprofloxacin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(12): 2752-2758.
- [13] Saravanan R, Mohanram H, Joshi M, et al. Structure, activity and interactions of the cysteine deleted analog of tachyplesin-1 with lipopolysaccharide micelle: Mechanistic insights into outer-membrane permeabilization and endotoxin neutralization [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, 2012, 1818(7): 1613-1624.
- [14] Zhang Y, Liu X, Wang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289.
- [15] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, 2007, 1768(5): 1160-1169.
- [16] Jung S, Lodge T P, Reineke T M. Complexation between DNA and Hydrophilic-Cationic Diblock Copolymers [J]. *J Phys Chem B*, 2017, 121(10): 2230-2243.
- [17] 姜交龙, 张涛, 江波, 等. 杜仲内生真菌代谢产物对大肠杆菌的作用机理研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 110-113.
- [18] Cao W, Peng X, Chen X, et al. Facile synthesis of cationic polymer functionalized nanodiamond with high dispersity and antibacterial activity [J]. *J Mater Sci*, 2017, 52(4): 1856-1867.
- [19] 郝刚. Bufen II 抗菌肽的分子设计及对 DNA 作用抑菌机理研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [20] Odsbu I, Skarstad K. DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA [J]. *Microbiology*, 2014, 160(5): 872-882.
- [21] 周琢艳, 刘玉寒, 刘文洪, 等. 铁皮石斛内生真菌的分离及其体外抑菌和抗肿瘤活性初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 533-538.
- [22] 葛飞, 唐尧, 龚倩, 等. 40 株银杏内生真菌抗菌活性比较及其活性成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1554-1559.
- [23] 张慧茹, 孟素香, 曹健, 等. 绞股蓝内生真菌抗大肠杆菌抗菌机制的研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 157-162.
- [24] Alpha C J, Campos M, Jacobs-Wagner C, et al. Mycofumigation by the volatile organic compound-producing fungus *Muscodor albus* induces bacterial cell death through DNA damage [J]. *Appl Envir Microbiol*, 2015, 81(3): 1147-1156.