

牡蛎共生细菌的分离、鉴定及次级代谢产物生物活性研究

王焕南¹ 杨 华² 顾英琳¹ 闫茂才¹ 徐宗玲¹ 孙海铭¹ 张 震¹

(1. 济宁医学院 药学院, 山东 日照 276800; 2. 聊城大学 山东省化学储能与新型电池技术重点实验室, 山东 聊城 252059)

摘 要 对日照海域野生牡蛎共生细菌进行分离鉴定, 研究其次级代谢产物的生物活性. 采用常规平板分离方法对牡蛎共生细菌进行分离、培养并进行分子生物学鉴定; 采用改良 Ellman 法和 DPPH 自由基清除法对共生菌的次级代谢产物进行抑制乙酰胆碱酯酶(AChE) 和抗氧化活性筛选. 结果表明, 从日照海域野生牡蛎中共分离得到 62 株共生细菌, 其中, 4 株属于弧菌属, 6 株属于芽孢杆菌属, 4 株为鲁杰式菌属, 3 株为黄杆菌属, 3 株为交替单胞菌属, 1 株为嗜热脂肪芽孢杆菌属, 其余均为交替假单胞菌属. 共生细菌中对 AChE 具有较强抑制活性的有 13 株, 尤其是菌株 HYML-1-11 和 HYML-1-62, 抑制 AChE 的 IC_{50} 值分别为 5.01 和 4.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 具有一定抗氧化活性的有 22 株, 其中 HYML-1-6、HYML-1-11、HYML-1-18、HYML-1-24、HYML-1-39、HYML-1-47 和 HYML-1-62 号菌株的次级代谢产物(5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 DPPH 自由基的清除率均达 40% 以上.

关键词 牡蛎; 共生细菌; 乙酰胆碱酯酶; 抗氧化活性; 分子生物学鉴定

中图分类号 Q93-3

文献标识码 A

0 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 又称遗忘型痴呆症, 是一种神经系统退行性疾病, 严重影响患者的认知、记忆以及社会生活能力^[1,2]. AD 的发病机制一直是研究者密切关注的问题, 其中主要涉及胆碱能功能障碍、A β 淀粉样蛋白、氧化应激及自由基损伤等^[3]. 目前临床治疗 AD 主要采用以乙酰胆碱酯酶(AChE) 为药物靶点的乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEIs); 另有研究指出, 氧化应激可能会增加自由基的水平, 从而导致 A β 淀粉样蛋白升高^[4-7], 因此清除细胞内过剩的自由基或成为治疗 AD 的新方向.

海洋中蕴藏巨大微生物资源, 它们在长期生态胁迫与生态竞争中形成自我防御体系, 其中次级代谢产物是生物防御的主要功能分子, 而这些功能分子具有化学结构新颖、生物活性多样等特点. 牡蛎营养丰富, 有研究表明长期食用对老年痴呆具有一定的防护作用^[8,9]. 基于内共生学说, 牡蛎共生菌可能产生抗老年痴呆活性成份. 因此, 本研究从日照海域牡蛎中分离纯化出共生菌株, 以期筛选出具有较强抑制乙酰胆碱酯酶及抗氧化活性的菌株, 从而为海洋天然产物开发提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牡蛎及菌株来源. 在日照海域采集野生牡蛎, 通过分离纯化得到共生细菌.

1.1.2 培养基(g/100 mL). LB 液体培养基: 胰蛋白胨 1 g, 酵母浸粉 0.5 g, 过滤灭菌海水 100 mL, PH 自然; LB 固体培养基: LB 液体培养基 + 1.6% 琼脂粉.

1.1.3 主要仪器和试剂. 恒温振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), 恒温生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司), PCR 仪(美国 BIO-RAD), 多功能检测仪(美国 Biotek 公司), 旋转蒸发器(上海亚荣仪器有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增等试剂均购自天根生化科技有限公司, 碘代硫代乙酰胆碱

收稿日期: 2019-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(21701078); 山东省自然科学基金(ZR2016BL05); 济宁医学院科研扶持基金(JYFC2018KJ027) 资助

通讯作者: 张震, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 海洋药物化学, E-mail: zhangzhen_1029@126.com.

(ATCI)、乙酰胆碱酯酶(AChE)及DTNB,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)等试剂均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 牡蛎内生细菌分离与纯化. 将新鲜野生牡蛎于75%酒精中浸泡30-60 s, 无菌海水润洗3次, 称取10 g牡蛎肉于100 mL灭菌海水中浸泡, 160 r·min⁻¹振荡45 min, 匀浆, 过滤得牡蛎菌悬液. 无菌条件下从菌悬液中吸取10 μL至三角瓶中, 灭菌海水补足至500 mL, 得到10⁻¹的菌液, 然后梯度稀释分别得到10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹菌液. 吸取100 μL上述各浓度菌液均匀涂布于LB固体培养基上, 置于37℃恒温培养箱中, 定期观察, 分离纯化得到单一菌落。

1.2.2 牡蛎内生细菌的鉴定. 参照文献^[10]提取已分离纯化菌株的DNA, 以27F/1492R为引物进行PCR扩增, PCR反应条件为: 预变性95℃3 min→变性95℃45 s→退火55℃45 s→延伸72℃50 s→充分延伸72℃10 min→保存16℃2 min→循环扩增35次, 取5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 其余送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.3 牡蛎内生细菌次级代谢产物发酵液提取. 将分离出的菌株接种至LB液体培养基中, 恒温振荡培养(36 h, 37℃, 160 r·min⁻¹). 离心发酵液(6500 r·min⁻¹, 25 min)取上清, 2倍体积乙酸乙酯萃取3次, 合并乙酸乙酯层, 浓缩得粗浸膏, 将上述粗浸膏溶于DMSO, 配置成5 mg·mL⁻¹溶液备用。

1.2.4 AChE活性测定. 参照文献^[11]采用改良Ellman法测定其对AChE的抑制活性. 磷酸缓冲溶液(0.1 mol·L⁻¹, PH=8.0), AChE(0.05 U·mL⁻¹), DTNB(0.0667 mol·L⁻¹), ATCI(0.1 mmol·L⁻¹). 取4支5 mL EP管, 设置空白(A₁)、标准(A₂), 样品本底(A₃), 样品(A₄)组. 分别加入磷酸缓冲溶液2950 μL、2880 μL、2950 μL和2880 μL; A₁和A₂组中分别加入DMSO 100 μL; A₃和A₄组中加入100 μL的待测样品溶液; A₂和A₄组加入70 μL的AChE溶液. 充分混匀, 冷藏20 min后, 分别加入100 μL的DNTB和20 μL的ATCI溶液, 得到最终的反应体系. 37℃水浴反应25 min后, 加终止剂0.4% SDS(100 μL). 本实验以盐酸他克林(Cognex)作为阳性对照. 在412 nm处测得OD值, 按公式计算出抑制率

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_2 - A_1) - (A_4 - A_3)}{A_2 - A_1} \times 100\%.$$

1.2.5 抗氧化活性测定. 参照文献^[12,13]方法, 采用DPPH自由基清除法测定牡蛎内生细菌次级代谢产物的抗氧化活性. 以75%乙醇作为参比溶液调零, 空白组(A₀)中加入75%乙醇100 μL, DPPH溶液(0.4 mmol·L⁻¹)100 μL; 样品组(A_i)中加入待测样品2 μL, 75%乙醇98 μL, DPPH溶液100 μL; 样品本底组(A₁)中加入待测样品2 μL, 75%乙醇198 μL, 以抗坏血酸(Vc)为阳性对照. 室温暗置30 min后, 在最大波长为517 nm测OD值, 按照公式计算清除率

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_1)}{A_0} \times 100\%.$$

1.2.6 菌株特性观察. 菌株部分生理生化等特性参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]进行。

2 结果分析

2.1 牡蛎共生细菌的分子生物学鉴定

通过对牡蛎共生细菌进行分离纯化、培养, 共得到并鉴定出牡蛎共生细菌62株. 采用通用引物27F和1492R进行PCR扩增, 经琼脂糖凝胶电泳, 基因测序结果经Blastn比对, 结果表明, HYML-1-6、HYML-1-25、HYML-1-34和HYML-1-44菌株为孤菌属; HYML-1-11、HYML-1-22、HYML-1-27、HYML-1-37、HYML-1-38和HYML-1-40菌株为芽孢杆菌属; HYML-1-4、HYML-1-12、HYML-1-19、HYML-1-31菌株为运动鲁杰氏菌; HYML-1-15、HYML-1-16、HYML-1-46菌株为黄杆菌; HYML-1-14、HYML-1-20、HYML-1-52菌株为交替单胞菌; HYML-1-47菌株为嗜热脂肪芽孢杆菌; 其余41株菌株为交替假单胞菌属, 因此, 假单胞菌属为牡蛎共生细菌中优势菌属. 部分菌株16S rRNA基因序列比对分析结果如表1所示。

2.2 牡蛎内生细菌次级代谢产物抑制AChE活性筛选

对牡蛎内生细菌的次级代谢产物进行抑制AChE活性筛选, 结果如图1所示, 有13株细菌的次级代谢产物粗提物(5 μg·mL⁻¹)对AChE具有一定的抑制活性, 分别为HYML-1-3, HYML-1-6, HYML-1-9, HYML-1-10, HYML-1-11, HYML-1-12, HYML-1-18, HYML-1-24, HYML-1-26, HYML-1-27, HYML-1-39, HYML-1-47, HYML-1-62. 其中, HYML-1-11和HYML-1-62菌株次级代谢产物的活性较强, 抑制AChE活性IC₅₀分别为

5.01 和 $4.53 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

表 1 部分菌株 16S rRNA 基因序列比对分析

菌株名称	同源菌株	相似度 / %	Genbank 登录号
HYML-1-1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain 7-13	98.93	KX806608
HYML-1-24	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain DZ-03-08-car	99.93	MK577349
HYML-1-6	<i>Vibrio</i> sp. sx2w6	100	FJ025776
HYML-1-34	<i>Vibrio kanaloae</i> strain HHN-45	99.82	KT023527
HYML-1-11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain LD5	99.86	GQ853414
HYML-1-22	<i>Bacillus</i> sp. Z69	100	MG470720
HYML-1-4	<i>Ruegeria mobilis</i> NBRC 101030	99.78	KT989859
HYML-1-12	<i>Ruegeria mobilis</i> strain Sh2	100	KP843693
HYML-1-15	<i>Flavobacterium</i> sp. THG-N2.3	99.67	MH447399.1
HYML-1-16	<i>Flavobacterium</i> sp. 1E403	99.95	MH209250.1
HYML-1-14	<i>Alteromonas</i> sp. Q04	99.73	KY818841.1
HYML-1-20	<i>Alteromonas</i> sp. ML52	99.54	MH916568.1
HYML-1-47	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain	99.86	KU529690

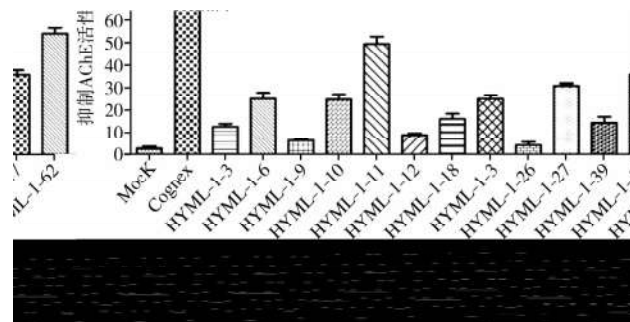


图 1 牡蛎内生细菌次级代谢产物抑制 AChE 活性

2.3 牡蛎内生细菌次级代谢产物抗氧化活性筛选

进一步对 62 株菌株的次级代谢产物进行抗氧化活性筛选,结果如图 2 所示,22 株菌株的次级代谢产物 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 DPPH 自由基具有一定的清除作用,其中, HYML-1-6、HYML-1-11、HYML-1-18、HYML-1-24、HYML-1-39、HYML-1-47、HYML-1-62 的抗氧化活性显著,对 DPPH 自由基的清除率分别为 53.76 %、62.87 %、42.15 %、61.13 %、62.91 %、47.79 % 和 40.83 %.

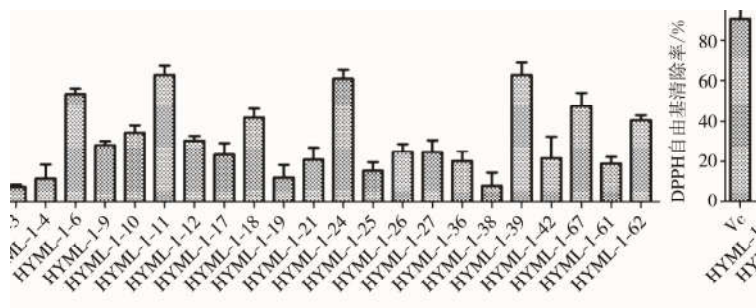


图 2 牡蛎内生细菌次级代谢产物抗氧化 DPPH 清除率 / %

2.4 牡蛎共生细菌的生理生化特征

以牡蛎共生细菌次级代谢产物对乙酰胆碱脂酶和抗氧化活性均具有较强抑制作用的 8 株菌株培养观察,对其进行部分生理生化特性试验^[14],结果见表 2.

3 结论与讨论

海洋资源因其特殊的环境,在长期的进化过程中产生一系列独特的次级代谢产物,这些次级代谢产物具

有化学结构新颖和生物活性多样的特点,因此海洋资源是产生新型生物活性物质的宝库^[15-17].研究表明,从海绵、藻类和海鞘等分离出的海洋细菌 *S. tropica*、*S. arenicola*、*S. pacifica*^[18-22]等,其次级代谢具有抗癌、抗菌、抗炎、抗疟等作用,其中一些已应用于临床,如环孢菌素 A、利福霉素、环马林素 D 等^[23-25].此外,海洋微生物中芽孢杆菌属的成员其次级代谢产物表现出多种独特的结构和生物活性^[26-28].王凤舞等从青岛海域牡蛎中分离得到 8 株内生细菌,然而仅一株细菌的次级代谢产物具有乙酰胆碱脂酶抑制活性,本研究从日照海域野生牡蛎中分离纯化得到 62 株内生细菌,对其进行分子生物学鉴定,结果显示,其中 4 株为孤菌属,6 株为芽孢杆菌属,4 株为鲁杰式菌属,3 株为黄杆菌属,3 株为交替单胞菌属,1 株为嗜热脂肪芽孢杆菌,其余 41 株为交替假单胞菌属,因此,交替假单胞菌属为牡蛎内生细菌中优势菌属.抑制 AChE 活性和抗氧化活性研究结果表明,13 株菌株具有一定的抑制 AChE 活性;22 株菌株显示较强的 DPPH 自由基的清除作用.此外还发现,具有 AChE 抑制作用的 13 株菌株的次级代谢产物均显示较强的抗氧化活性,揭示其次级代谢产物中含有潜在的活性物质,有望为治疗以胆碱能缺乏及自由基过剩为特征疾病的先导化合物的开发提供一定的理论依据.

表 2 内生细菌活性较强的 8 株菌株部分生理生化特性表

特性实验	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖发酵实验	—	+	—	+	—	—	—	+
硫化氢实验	—	+	—	—	—	+	—	—
V-P 实验	—	+	—	—	—	—	—	+
甲基红实验	—	—	—	—	—	+	—	—
柠檬酸盐实验	—	+	+	—	—	—	—	—
石蕊牛奶实验	—	+	+	+	+	—	+	+
明胶液化实验	—	+	—	+	+	—	+	—
触酶实验(H ₂ O ₂)	—	+	+	—	—	—	—	—
淀粉水解实验	—	+++	+	++	++	+	++	+++

注: 1: HYML-1-6, 2: HYML-1-11, 3: HYML-1-18, 4: HYML-1-24, 5: HYML-1-26, 6: HYML-1-27, 7: HYML-1-39, 8: HYML-1-47; “+”: 阳性; “—”: 阴性

参 考 文 献

- [1] Santos T C D, Gomes T M, Pinto B A S, et al. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for alzheimer's disease therapy[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:1192-1197.
- [2] Preetham E. Marine derived bioactive compounds for treatment of Alzheimer's disease[J]. Front Biosci, 2018, 10(3):537-548.
- [3] Butterfield D A, Boyd-Kimball D, Perry G, et al. Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 62(3):1345-1367.
- [4] Butterfield D A, Reed T, Newman S F, et al. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. [J]. Free Radical Bio Med, 2007, 43(5):658-677.
- [5] Ming J, O'Nuallain Brian, Wei H, et al. An in vitro paradigm to assess potential anti-A β antibodies for Alzheimer's disease[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):2676-2680.
- [6] Umeda T, Tanaka A, Sakai A, et al. Intranasal rifampicin for Alzheimer's disease prevention[J]. Alzheimers Dement; Transl Res Clin Interv, 2018, 4:304-313.
- [7] Wilkinson D G. Galantamine: a new treatment for Alzheimer's disease[J]. Expert Rev Neurother, 2001, 1(2):153-157.
- [8] 杨韵,徐波. 牡蛎的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12):1345-1349.
- [9] 陈艳辉,李超柱,黎丹戎. 牡蛎蛋白活性肽的分离及生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 15:135-138.
- [10] 刘子辰,李骑,张福康,等. 一株新铜绿假单胞菌噬菌体 SRT6 的分离以及全基因组序列分析[J]. 聊城大学学报, 2018, 31(3):67-78.
- [11] 宁杰. 地鳖虫中提取抑制乙酰胆碱酯酶活性物质的研究[D]. 2010.
- [12] Nicklisch S C T, Waite J H. Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins[J]. MethodsX, 2014, 1:233-238.
- [13] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9):317-322.
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] Blunt J W, Copp B R, Keyzers R A, et al. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2013, 30:237-323.
- [16] Blunt J W, Copp B R, Munro M H, et al. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2011, 28: 196-268.

- [17] Lane A L, Moore B S. A sea of biosynthesis; Marine natural products meet the molecular age[J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28:411-428.
- [18] Vidgen M, Hooper J N A, Fuerst J. Diversity and distribution of the bioactive actinobacterial genus *Salinispora* from sponges along the Great Barrier Reef[J]. *Anton Leeuw*, 2011, 101:603-618.
- [19] Jensen P R, Williams P G, Zeigler L, et al. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:1146-1152.
- [20] Kim T K, Garson M J, Fuerst J A. Marine actinomycetes related to the "Salinispora" group from the great barrier reef sponge *pseudoceratina clavata*[J]. *Environ. Microbiol*, 2005, 7: 509-518.
- [21] Ahmed L, Jensen P R, Freel K C, et al. *Salinispora pacifica* sp. nov. , an actinomycete from marine sediments[J]. *Anton Leeuw*, 2013, 103:1069-1078.
- [22] Maldonado L A, Fenical, W, Jensen P R, et al. *Salinispora arenicola* gen. nov. , sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov. , obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae[J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2005, 55:1759-1766.
- [23] Kim T K, Hewavitharana A K, Shaw P N, et al. Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction[J]. *Appl Environ Microb*, 2006, 72:2118-2125.
- [24] Feling R H, Buchanan G O, Mincer T J, et al. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42:355-357.
- [25] Fenical W, Jensen P R. Developing a new resource for drug discovery; Marine actinomycete bacteria[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 666-673.
- [26] Nithya C, Devi M G, Karutha P S. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species[J]. *Biofouling*, 2011, 27:519-528.
- [27] Yang S C, Lin C F, Chang W Y, et al. Bioactive secondary metabolites of a marine *Bacillus* sp. inhibit superoxide generation and elastase release in human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1[J]. *Molecules*, 2013, 18:6455-6468.
- [28] Mondol M A M, Shin H J, Islam M T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species; Chemistry and biological activity[J]. *Mar Drugs*, 2013, 11:2846-2872.
- [29] 王凤舞,翟雅文,陈廉晨,等.一株具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的牡蛎内生细菌筛选鉴定及发酵条件优化[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 31(4):284-289.

Study on Isolation, Identification and Bioactivity of Secondary Metabolites from Oysters Symbiotic Bacteria

WANG Huan-nan¹ YANG Hua² GU Ying-lin¹ YAN Mao-cai¹

XU Zong-ling¹ SUN Hai-ming¹ ZHANG Zhen¹

(1. School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276800, China; 2. Shandong Key Laboratory of Chemical Energy Storage and New Battery Technology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Objective to isolate and identify symbiotic bacteria from wild oyster in Rizhao offshore area and study the biological activities of their secondary metabolites. Oyster symbiotic bacteria were isolated, cultured and identified by conventional plate separation method. The inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant activity of secondary metabolites of symbiotic bacteria were screened by modified Ellman method and DPPH free radical scavenging method. The results showed that 62 strains of symbiotic bacteria were isolated from wild oysters in Rizhao sea area, among them, 4 strains belonged to *Vibrio* sp. , 6 strains belonged to *Bacillus* sp. , 4 strains belonged to *Ruegeria mobilis* sp. , 3 strains belonged to *Flavobacterium* sp. , 3 strains belonged to *Alteromonas* sp. , 1 strains belonged to *Geobacillus* sp. , and the rest were *Alternate Pseudomonas* sp. . 13 strains of symbiotic bacteria showed strong inhibitory activity against AChE, the IC_{50} of strains HYML-1-11 and HYML-1-62 on AChE were 5.01 and 4.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. 22 strains had significant antioxidant activity, and the scavenging rates of DPPH free radicals by secondary metabolites of strains HYML-1-6, HYML-1-11, HYML-1-18, HYML-1-24, HYML-1-39, HYML-1-47 and HYML-1-62 were all over 40%.

Key words oyster; symbiotic bacteria; acetylcholinesterase; antioxidant activity; identification