

校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620111152316

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

高通量抗菌活性筛选模型的构建及两株海
洋真菌次级代谢产物的研究

Construction of High Throughput Antibacterial Screening
and The Study on the Secondary Metabolites from two
Marine Fungi

陈卓

指导教师姓名: 陈建明 研究员

陶懿 教授

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

目录	I
摘要	1
ABSTRACT	2
第一章 前言	1
1.1 海洋真菌次级代谢产物的研究概况	1
1.1.1 研究背景	1
1.1.2 海洋真菌化学成分与生物活性的多样性	2
1.2 刃天青显色法在检测, 评价次级代谢产物抗菌活性中的应用	10
1.3 本课题的研究目的, 意义及技术路线	13
第二章 材料与amp;方法	15
2.1 材料	15
2.1.1 菌株来源	15
2.1.2 常用溶液	16
2.1.3 常用培养基	17
2.1.4 主要试剂及耗材	18
2.1.5 主要仪器	19
2.2 方法	20
2.2.1 海洋真菌初级馏分库的建立	20
2.2.2 抗菌活性测定	21
2.2.3 真菌鉴定	26
2.2.4 海洋真菌次级代谢产物分离纯化	29

2.2.5 化合物结构鉴定.....	33
2.2.6 化合物抗菌活性测定.....	34
第三章 结果与分析.....	35
3.1 刃天青显色法在抗菌活性测定中的应用.....	35
3.1.1 MRSA CGMCC 1.12409和MRSA ATCC 43300 的药敏实验结果	35
3.1.2 刃天青显色法条件优化.....	36
3.1.3 刃天青显色法测定 MIC	41
3.1.4 琼脂稀释法测定 MIC	45
3.1.5 通过显微镜观察法进一步确定 MIC	47
3.1.6 刃天青显色法高通量筛选抗菌活性馏分.....	48
3.2海洋真菌<i>Engyodontium album</i>次级代谢产物研究.....	49
3.3海洋真菌<i>Aspergillus flavus</i>次级代谢产物研究.....	55
3.4 化合物抗菌活性分析.....	60
3.4.1 新化合物 EngyodontiuminA 抗菌活性分析	60
3.4.2 已知化合物的抗菌活性分析.....	61
第四章 讨论与小结.....	62
4.1 高通量抗菌活性筛选模型的建立.....	62
4.2 海洋真菌的次级代谢产物及其生物活性.....	63
参考文献.....	65
附录一 化合物核磁谱图.....	72
致谢.....	82

Contents

Content	I
Abstract	1
Abstract	2
Chapter1	1
1.1 Advance on secondary metabolites from marine fungi.....	1
1.1.1 Research background	1
1.1.2 Diversity of the chemical composition and biological activity from marine fungi	2
1.2 Resazurin as a indicator to determine strains viability in HTS of secondary metabolites	10
1.3 Purpose,significance and technical line of this thesis.....	13
Chapter2 Materials and methods	15
2.1 Materials	15
2.1.1 Strains	15
2.1.2 Solutions	16
2.1.3 Mediums	17
2.1.4 Reagents.....	18
2.1.5 Main equipments.....	19
2.2 Methods.....	20
2.2.1 Establishment of primary fractions library from marine fungi.....	20
2.2.2 Determination of antibacterial activity.....	21
2.2.3 Identical of marine fungi	26
2.2.4 The isolation of the secondary metabolites from marine fungi	29
2.2.5 The structure of compounds.....	33
2.2.6 Determination of antibacterial activity of compounds.....	34

Chapter3 Results and analysis	35
3.1 Application of a resazurin-based HTS assay.....	35
3.1.1 Results of susceptibility test.....	35
3.1.2 Optimization of the resazurin method.....	36
3.1.3 Evaluation of antibacterial activity by resazurin method	41
3.1.4 Evaluation of antibacterial activity by agar diffusion.....	45
3.1.5 Evaluation of antibacterial activity by microscope.....	47
3.1.6 Screening campaigns	48
3.2 The study of secondary metabolites from marine fungus	
<i>Engyodontium album</i>	49
content.....	49
3.3 The study of secondary metabolites from marine fungus	
<i>Aspergillus flavus</i>	55
3.4 Analysis of antibacterial activity of compounds	60
3.4.1 Analysis of antibacterial activity of EngyodontiuminA.....	60
3.4.2 Analysis of antibacterial activity of known compounds.....	61
Chapter4 Discussion and conclusion	62
4.1 Development of a high throughput antibacterial activity	
screening model.....	62
4.2 The secondary metabolites and bioactivities from marine	
fungi.....	63
References.....	65
Appendix 1 NMR results of compounds	72
Acknowledgements	82

摘要

海洋是地球万物的生命之源，海洋中生存着地球上 80% 以上的生物资源，海洋生物的生态环境和陆地生物有很大的差别。海洋微生物具有极为丰富的生物多样性及功能多样性，由于其特殊的生存环境，在适应环境的进化过程中形成了独特的遗传代谢机制和化学防御机制，是目前新结构或新活性天然产物的主要来源。海洋真菌作为海洋微生物的主要组成部分成为近年来国内外学者研究的焦点，国内外学者已经从海洋真菌的次级代谢产物中分离得到大量的活性物质。

本论文以抗菌活性作为生物活性筛选的靶向目标，采用刃天青显色法，对刃天青显色法的实验条件进行优化，选取已上市的抗菌药物评价刃天青显色法在测定 MIC 中的适用性，建立了受试菌株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，黑曲霉的两种高通量抗菌筛选模型。克服了传统抗菌活性筛选方法如：琼脂稀释法，纸片法，E-test 等方法费时费力，浪费实验材料，不适用于所有筛选样品的缺点，实现了对海洋真菌初级馏分的高通量筛选，具有经济，准确，省时省力等优点。

以上述海洋真菌初级馏分的筛选结果为参考，选取了其中两株真菌(白色侧齿霉 MCCC 3A00236，黄曲霉 MCCC 3A00246)对其的次级代谢产物进行研究，采用硅胶柱层析，反相柱层析，制备型 HPLC，凝胶柱色谱(Sephadex LH20)等分离方法，刃天青显色法进行活性跟踪，共分离得到了 39 个化合物，采用质谱、紫外、核磁共振 (NMR)、2DNMR 等现代波谱学手段和理化性质确定化合物的结构，截止目前，一共鉴定了 13 个单体化合物 (化合物 1~13)，其中化合物 1 为新化合物，其他为已知化合物。在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试浓度下，化合物 1 表现出对黑曲霉，MRSA, 轮虫弧菌，坎氏弧菌，创伤弧菌良好的抗菌活性，抑制率都在 70% 以上，其中对弧菌的抑制率达到 100%，对本实验中受试菌株的 MIC 在 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内。其他的已知化合物中也有一定比例的化合物表现出良好的抗菌活性：化合物 2,3 对黑曲霉，轮虫弧菌，坎氏弧菌有抗菌活性 (抑制率在 90% 以上和 60% 以上)，化合物 6 对黑曲霉有良好的抗菌活性，化合物 10,13 对 MRSA，黑曲霉，轮虫弧菌，坎氏弧菌具有良好的抗菌活性，抑制率均在 90% 以上。

关键词：海洋真菌；化合物；抗菌；高通量筛选

ABSTRACT

Ocean is the place of origin of life. The hot spot has been focused on more complex marine resources because of the decrease of discovering novel bioactive metabolites from terrestrial organisms. During adapting to oceanic ecosystem, marine fungi as a major component of marine microorganisms, can produce numerous secondary metabolites with unique structures, novel skeletons and varied bioactivities.

In this paper, the antibacterial activity was used as a target goal of bioassay. We developed and validated a convenient method for high throughput screening (HTS) of anti-MRSA and *Aspergillus niger* agents employing the dye resazurin as an indicator of cell growth. The parameters of the resazurin screening method were optimized. This method showed good reproducibility and sensitivity. It is easy to use, sensitive to changes in cell numbers, and inexpensive. The methodology can be scaled up to primary HTS assays of a large collection of extracts.

Based on the results of high throughput screening, we picked two marine fungi (*Engyodontium album*, *Aspergillus flavus*) to do the research of its secondary metabolites. The extract of the fungus was purified by column chromatography, reverse phase chromatography and preparative HPLC combined with TLC, HPLC to get 39 compounds. Their structures were established by physicochemical properties and spectral analysis. Up to now, 13 compounds were identified (compound 1~13), compound 1 was identified as new compound. The concentration is 200 µg/mL, compound 1 showed good antibacterial activities to *Aspergillus niger*, MRSA, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio vulnificus*. The MIC was 128 µg/mL~256 µg/mL. Other compounds also show good antibacterial activities: compound 2, 3 shows good antibacterial activities to *Aspergillus niger*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio campbellii*, compound 6 shows good antibacterial activities to *Aspergillus niger*, compound 10, 13 showed good antibacterial activities to *Aspergillus niger*, MRSA, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio campbellii*.

Keywords: marine fungi; compound; antibacterial activities; HTS

第一章 前言

1.1 海洋真菌次级代谢产物的研究概况

1.1.1 研究背景

真菌是通过吸附于有机物质上进行渗透营养生长的异养真核生物。海洋真菌是海洋微生物的一个重要分支，海洋真菌不是分类学上的概念，而具有生态学意义，是指那些能形成孢子的，生活在海洋中真核微生物。海洋真菌作为海洋微生物的重要组成部分，代谢产物化学多样性丰富，生物活性多样，已成为现代研究的焦点^[1-5]。海洋真菌对于海洋生活环境的适应，造就了海洋真菌特立独行的代谢途径和遗传背景，所以海洋真菌通常能产生不同于陆地真菌的活性代谢产物。

海洋真菌次级代谢产物的研究开始于 1953 年，其研究对象主要是海洋丝状真菌。Newton 和 Abraham 从分自撒丁岛排水沟污泥中的一株海洋真菌顶头孢霉菌 *Cephalosporium acremonium* 的发酵产物中分离鉴定了抗菌化合物 cephalosporin N^[6]，两年之后，又分离鉴定了抗菌化合物 cephalosporin C^[7]，但随后的几十年里海洋真菌天然产物的报道并不多见。1983 年，从 *Tolyocladium inflatum* 分离出来的环孢菌素 A 被批准成为临床使用的免疫抑制剂极大地提高了科学家对海洋真菌次级代谢产物研究的兴趣^[4]。海洋真菌天然产物的研究从上世纪 90 年代之后进入了快速发展的阶段，海洋真菌成为继海洋放线菌之后又一研究热点。

据估计，海洋真菌至少有 1500 种^[8]。但截止到 2000 年，被描述过的海洋真菌只有约 444 种，不到陆地真菌总数（约 5 万种）的 1%。主要是半知菌类(Fungi imperfecti)和丝状子囊菌(*Filamentous ascomycetes*)，其中以曲霉菌和青霉菌居多。海洋生活环境中的真菌大多位于透光层，主要是近海区域的各种基底上，如海洋中的海水、浮木以及海绵、海藻、珊瑚、贝类、海鱼等海洋动植物^[4]。Kohlmeryer

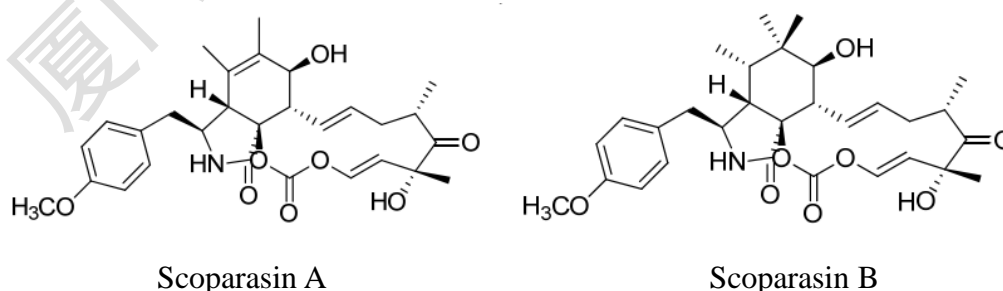
& Kohlmeyer (1979) 认为, 对海洋真菌分布起决定作用的主要因素是可利用的营养源或宿主、氧气、温度和压力等^[9]。海洋高压,高盐,低光照等条件使海洋真菌能够产生更多区别于陆生真菌的结构新奇,活性独特的天然产物,如生物碱类,聚酮类,萜类,醌类等,其中不乏具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等活性的化合物^[10-15],为寻找潜在的药物先导化合物提供了重要来源,是海洋药物研究的热点。

1.1.2 海洋真菌化学成分与生物活性的多样性

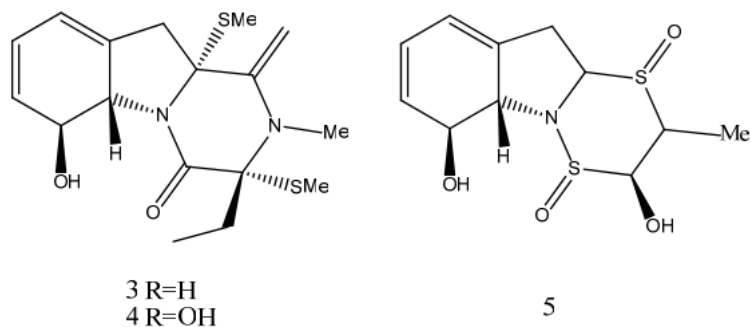
近期研究表明,海洋真菌是具有生物活性的,新的天然产物的重要来源。对目前从海洋真菌发酵产物中发现的 1,117 个新的次生代谢产物进行研究,发现主要以含氮类化合物(主要为生物碱类)和聚酮类化合物为主,并发现了特征性的卤代化合物。除此之外还有萜类,肽类,醌类等。以下依次进行阐述:

1.1.2.1 生物碱类

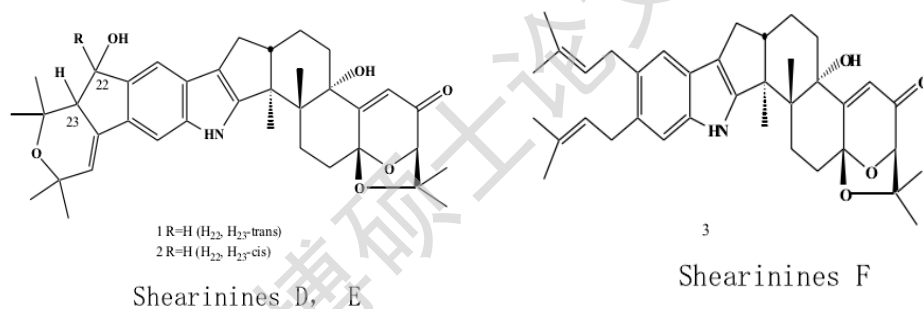
生物碱是一类复杂多样的含氮杂环化合物,常具有生物活性。很多文献报道海洋来源的生物碱具有多种生物活性,主要为抗菌,抗肿瘤,抗病毒等。来自于海洋真菌 *Eutypella scoparia* PSU-D44 的生物碱类化合物松胞素 scoparasin A,B 在抗菌活性试验中表现出非常有意义的抑制活性,抑制 *S. aureus* ATCC 25923 和 *M. gypseum* SH-MU-4. 的 IC_{50} 分别为 30-50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ^[16]。



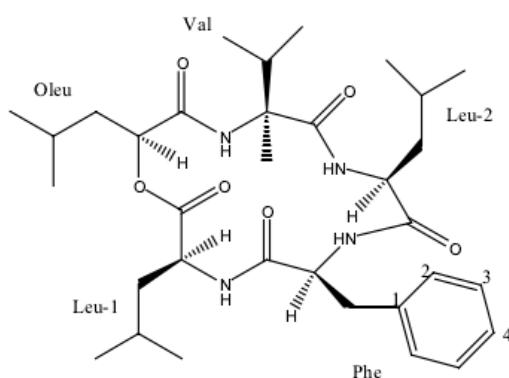
从海洋真菌 *Pseudallescheria sp.* 培养液中分离到的 3 种生物碱类化合物(3-5) 新二酮哌嗪,均表现出不同程度的抗菌活性,对耐甲氧苯青霉素和多重耐药性的金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度 MIC 分别为 31.2、31.2 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[17]。



由 Olga F. Smetanina 等从海洋真菌 *Penicillium janthinellum* 中分离出三个新吡啶生物碱化合物 Shearinines D, E, and F。Shearinines D, E 可诱导人白血病细胞 HL-60 的凋亡。shearinine E 也可抑制 EGF 诱导的 JB6 P⁺Cl 41 的恶性转化^[18]。



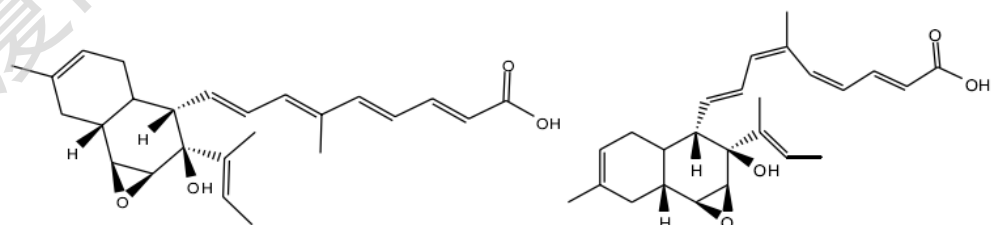
从一株海洋真菌中发现的一个新化合物 Sansalvamide, 美国国家癌症研究所 (NCI) 测定了其对 60 种细胞株的细胞毒活性, 平均 IC₅₀ 为 27.4 μg/mL, 其中对黑色素瘤细胞株 SK-MEL-2 和结肠癌细胞株 COLO205 的 IC₅₀ 分别为 5.9 和 3.5 ng/mL, 这一结果比 FDA 批准的一些抗肿瘤剂显示出的细胞毒活性还要高^[19]。

Sansalvamide^a

1.1.2.2 聚酮类

聚酮类化合物作为天然产物中的一类重要活性成分,是一类由聚酮合酶催化合成的,由细菌、真菌和植物将低级羧酸通过连续的缩合反应产生的结构复杂,用途广泛的天然产物,具有多种药理活性,如抗细菌、抗真菌、抗肿瘤活性以及作为酶抑制剂的活性等。

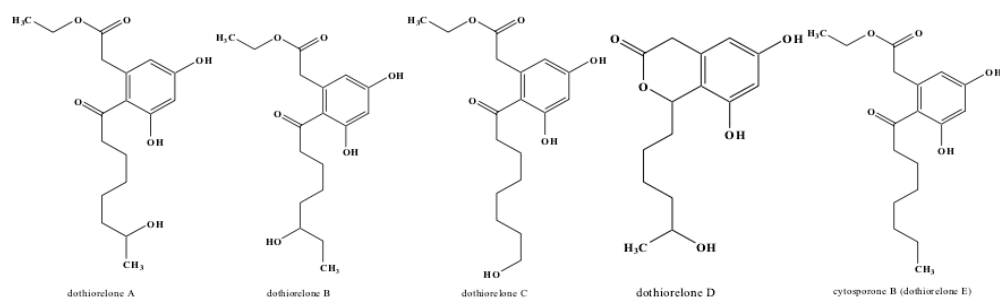
从内生真菌 *anthracobia* sp.的发酵产物中分离得到的两个新的聚酮类化合物 anthracobic acids A 及 B。光谱数据显示含有一个与羧基共轭的链烯存在,具有抑制 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. 的活性。另有文献报道了内生真菌 *Anthracobia* sp.产生的次级代谢产物 anthracobic acids A, B 可能防止寄主被植物病原菌感染的机制^[20]。



Anthracobic A

Anthracobic B

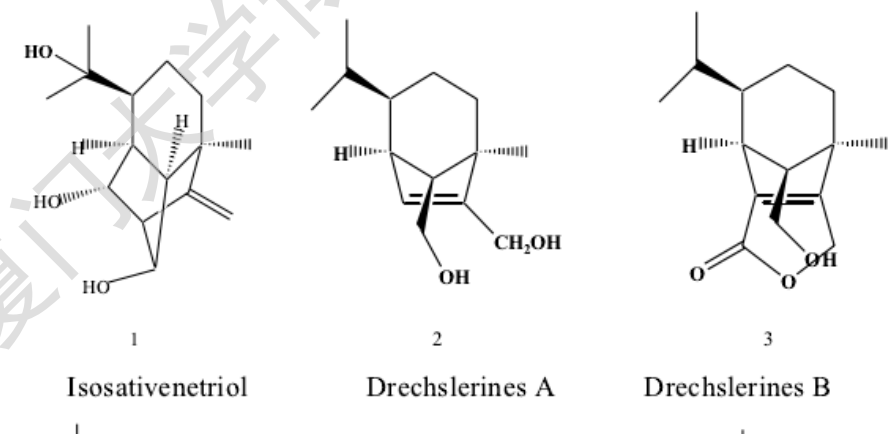
徐庆妍博士从福建九龙江口浮宫分离得到的海洋真菌 HTF3 中分离得到 4 个结构新颖的聚酮类化合物 Dothirelones A~D 和已知化合物 DothireloneE (Cytosporone B)。它们都具有良好的抗肿瘤活性。DothireloneA 还可能作为目前被广泛使用的弯孢霉菌素的合成前体^[21]。

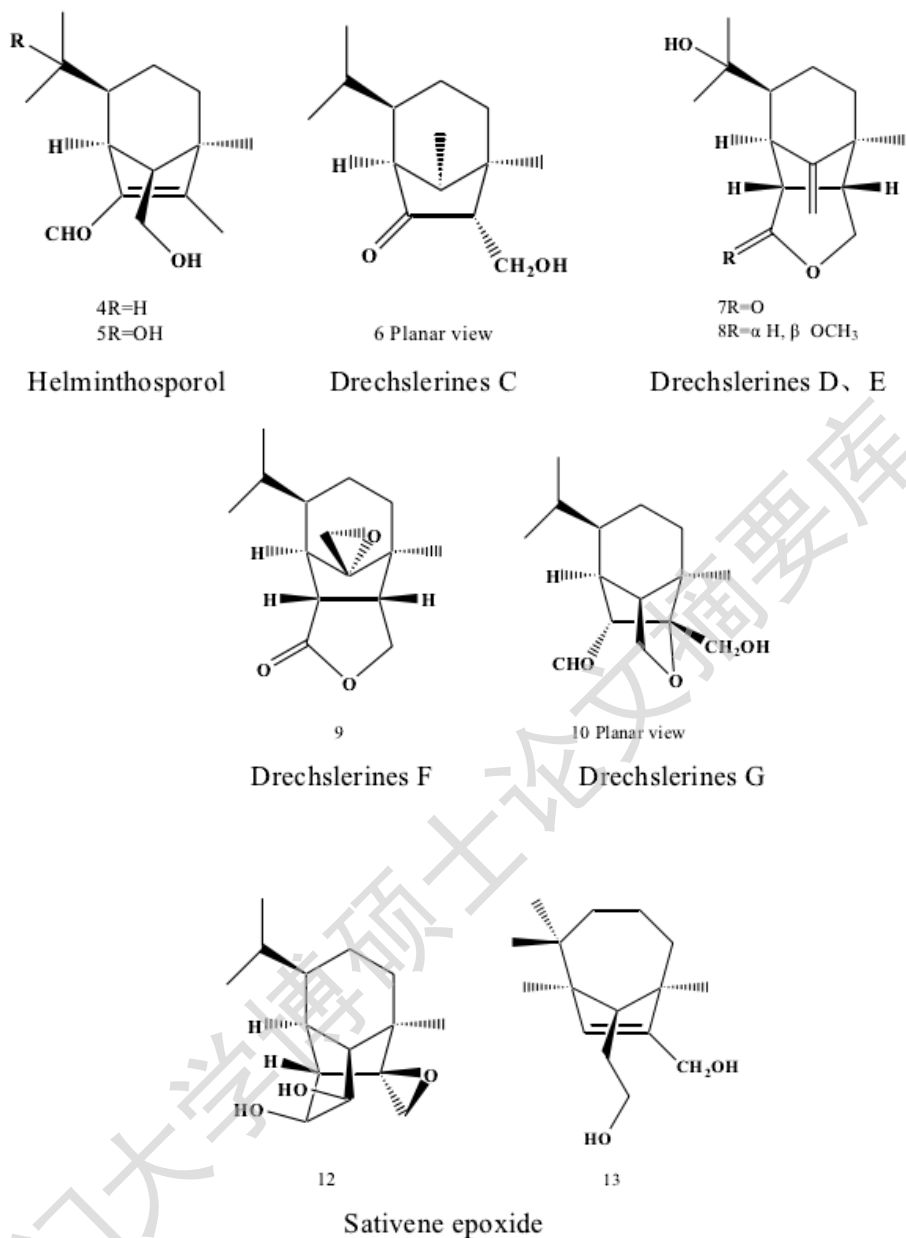


Dothirelones A~E 的结构

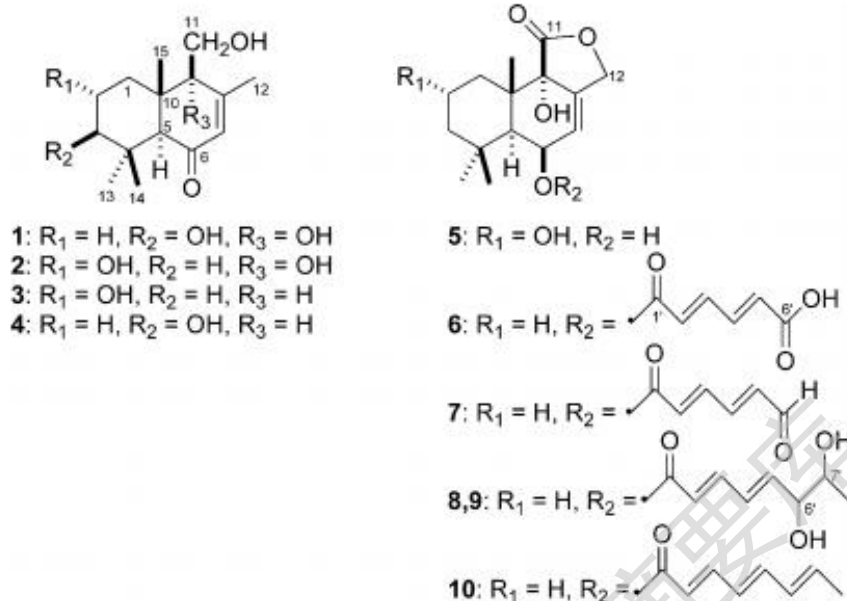
1.1.2.3 萜类及醌类

萜类化合物是分子式为异戊二烯的整数倍的烯烃类化合物。在海洋生物体内提取出了大量的萜类化合物，具有重要的生理活性，是研究天然产物和开发新药的重要来源。由 Claudia Osterhage 研究小组从海洋真菌 *Drechslera dematioidea* 中分离得到了是个新的倍半萜烯化合物 Isosativenetriol (1), Drechslerines A、B (2,3), 9-hydroxyhelminthosporol (5), Drechslerines C~G (6-10), Sativene epoxide (12,13), 通过活性实验显示有抗菌, 抗线虫, 抗疟疾等多种生物活性^[22]。

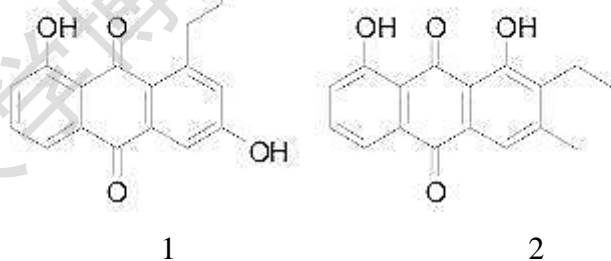




2009年 Liu 等人从海洋真菌 *Aspergillus ustus* 的发酵产物中分离得到了 10 个化合物，其中 7 个为新的倍半萜类化合物 (1~3, 6~9)，另外 3 个为已知化合物 (4, 5, 10)，化合物 6,7 对肿瘤细胞株 Hela, L5178Y, 和 PC12 具有细胞毒性，其中化合物 7 的活性最好，对 L5178Y 的活性为 0.6 μg/mL^[23]。



醌类化合物是含有共轭环己二烯二酮或环己二烯二亚甲基结构的一类化合物的总称。醌类化合物具有多种多样的生物活性，例如：抗菌，抗肿瘤等。从海洋中分离的一株链霉菌（*Streptomyces sp.*）中就分离得到了两种葱醌类化合物 1,2。其中化合物 1 对 HL-60, BCTC-823 和 MDA-MB-435 细胞有中度的抑制活性^[24]。



1.1.2.4 肽类及卤代化合物

肽类化合物也是海洋真菌又一重要的次级代谢产物，在食品和医药产业中广泛应用。肽类化合物很多具有抗菌，抗病毒，抗肿瘤，提高免疫力等生理活性，成为近年来重点研究的对象。从海洋真菌 *Zygosporium masonii* 的发酵产物中分离得到的第一个含 D-氨基酸的环酯肽类化合物 Zygosporamide，结构虽然简单，但在 NCI 细胞株活性筛选中表现出了较强的选择性细胞毒性，其平均半数生长抑制浓度 GI₅₀ 值为 9.1 μM ；还能选择性抑制 CNS 肿瘤 SF2268 细胞株和肾脏肿

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库