

利用二维生物自显影技术快速检测追踪 金钱松内生真菌抗细菌活性成分

何佳¹, 赵启美², 陈钧³

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003

2. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471003 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的: 利用培养基覆盖二维薄层色谱生物自显影技术(2D-TLC bioautography)快速检测、追踪金钱松内生真菌抗细菌活性成分。方法: 以二维薄层色谱将金钱松内生真菌代谢产物样品展开, 以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为指示菌, 氯化三苯四氮唑(TTC)为显色剂, 采用培养基覆盖生物自显影技术对其抗细菌活性成分进行检测、追踪。结果: 该方法展开系统筛选简单, 抑菌斑位置准确、斑点清晰, 其优化条件为: 以乙酸乙酯: 正己烷(3:7)为弱极性展开系统, 甲醇: 二氯甲烷(1:9)为强极性展开系统, 用20%甘油滤纸对湿室保湿, 以14h菌龄的枯草芽孢杆菌为指示菌种子液, 自显影薄层板36℃培养14~18h, 1%TTC显色时间为1~2h, 含0.2%~0.6%琼脂的半固体肉汤培养基应使用混菌法生物自显影, 含1%琼脂半固体肉汤培养基应使用涂布法生物自显影。结论: 培养基覆盖二维薄层色谱生物自显影技术是一种快速检测、追踪抗菌活性成分的方法, 尤其适用于成分复杂的天然产物中抗菌成分研究。

关键词: 二维薄层色谱生物自显影; 金钱松; 内生真菌; 检测; 追踪; 抗菌活性成分

Study on Fast Detecting and Tracking of Antibacterial Active Components for Endophytic Fungi
in *Pseudolarix kaempferi* Gord. with 2D- TLC Bioautography

HE Jia¹, ZHAO Qi-mei², CHEN Jun³

(1. School of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. School of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

3. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Objective: To fast detect and track antibacterial active components for endophytic fungi in *Pseudolarix kaempferi* Gord. with agar overlay 2D- TLC bioautography. Method: The metabolites of endophytes fungus was developed with 2D- TLC, and antibacterial active components was detected and tracked by bioautography of *Bacillus subtilis* model and TTC coloration. Result: The results showed that the development system screening was easy, and antiblastic spot was accurate and limpid. Optimization technology was acetidin: N-hexane(3:7) as low-pole solvent system, methanol: dichloromethane(1:9) as polar solvent system, 20% glycerol filter paper as moisturizer, 14h age *Bacillus subtilis* indicating strain seed on thin layer plate cultivated for 14~18h, 1%TTC staining time 1~2h, bacterial mix method suitable to 0.2%~0.6% agar semisolid bouillon culture-medium, bacterial spread method suitable to 1% agar semisolid bouillon culture-medium. Conclusion: Agar overlay 2D-TLC bioautography is a fast method for detecting and tracking of antibacterial active components, and it is especially suitable to complicated natural product.

Key words 2D-TLC-bioautography; *Pseudolarix kaempferi* Gord; endophyte; detection; track; antibacterial active components

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0252-05

收稿日期: 2007-01-19

基金项目: 江苏省2004年度博士研究生创新计划项目(xm04-57)

作者简介: 何佳(1965-), 男, 副教授, 博士, 主要从事微生物来源活性物质研究。E-mail: hejia@mail.haust.edu.cn

目前,从天然产物中筛选、分离和提取天然抗菌成分已成为天然防腐剂和新药研发等研究领域的热点,使得建立灵敏、方便、快捷且相关性好的活性检测方法,在天然产物活性筛选中占有越来越重要的地位,尤其对初筛起着决定性的作用。薄层色谱生物自显影(TLC-bioautography)是一种将薄层色谱分离和生物活性测定相结合的活性筛选方法,活性成分可在薄层色谱板上直接显现肉眼可见的活性斑点,从粗提物中直接筛选出活性成分,是一种活性指导下的快速靶向追踪分离、筛选活性成分的方法^[1-3]。它将活性成分分离、定位和活性评价一次完成。目前,已有少量有关琼脂扩散法一维生物自显影的研究报道^[4-5],但是这种方法与培养基覆盖法二维薄层色谱生物自显影技术相比主要有以下不足:一维薄层色谱不易将成分复杂的样品完全分离,致使抑菌斑点的归属不清;不能将活性成分完全从薄层板中转移至培养基中,尤其会影响含量较少和不易扩散活性成分的表达;活性成分扩散到培养基后,由于平板培养基较厚,活性成分可扩散的空间较大,不易形成位置准确、轮廓清晰的抑菌斑点。

植物内生真菌能产生大量新的天然产物,有些内生真菌还可以产生与宿主植物相同或相近的代谢产物。近来发现的新天然产物11%来自植物和动物,38%来自土壤微生物,51%来自植物内生真菌,它已成为天然产物潜在的重要资源^[6-8]。金钱松(*Pseudolarix kaempferi* Gord.)为我国特有单属种、孑遗植物,本实验研究其内生真菌抗细菌成分时^[9],采用了培养基覆盖二维薄层色谱生物自显影(2D-TLC bioautography)技术。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 金钱松内生真菌 JY47 菌株

分离于金钱松叶。

1.1.2 指示菌

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 江苏大学医学技术学院提供。

1.1.3 肉汤半固体培养基

蛋白胨 10.0g,牛肉浸膏 5.0g,氯化钠 5g,蒸馏水 1000ml,加入0~1%琼脂。将上述各成分于蒸馏水中加热溶解,用1mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至7.2~7.4,分装于三角瓶内,于121℃ 15min高压灭菌,备用。

1.1.4 试剂

氯化三苯四氮唑(TTC) 上海试剂三厂;薄层层析硅胶GF₂₅₄(60型) 中国青岛海洋化工集团公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 国药集团化学试剂有限公司;氯霉素 华北制药有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.1.5 仪器

SPX-250B生化培养箱 上海跃进集团;QYC-211摇床 上海福玛试验设备有限公司;SW-CJ-2FD超净工作台 苏净集团;硅胶匀浆器 金坛市仪器厂;5μl微量进样器 上海安亭微量进样器厂;WD-9403C紫外分析仪 北京市六一仪器厂;2cm×7cm、10cm×10cm玻璃板;层析槽。

1.2 方 法

1.2.1 JY47 菌株代谢产物粗提物样品制备

于500ml的三角瓶中加入100ml马铃薯葡萄糖培养液,将内生真菌接种在培养液中,28℃摇床(120r/min)振荡培养7d。将内生真菌发酵液在-70~20℃条件下冻融3次,以释放胞内产物,过滤去菌丝体,将滤液浓缩,等体积乙酸乙酯萃取5次,得内生真菌代谢产物乙酸乙酯浸膏,用乙酸乙酯溶解浸膏,制备成200mg/ml供试样品。

1.2.2 含指示菌的半固体肉汤培养基制备

枯草芽孢杆菌种用液体肉汤培养基培养,增菌至10⁸CFU/ml,将1ml种子液加入已降温至50℃,100ml含0~0.6%琼脂的半固体肉汤培养基中,制备成含指示菌10⁶CFU/ml的半固体肉汤培养基。

1.2.3 薄层色谱板制备

用30%的盐酸浸泡玻璃板10min→自来水冲洗→洗衣粉水浸泡10min→自来水冲洗→竖着放置烘干。称取薄层层析硅胶GF₂₅₄(60型)30g,加入0.6%CMC-Na溶液95ml,匀浆器搅拌30min。用无水乙醇棉球擦拭玻璃板,铺板,待硅胶板自然晾干后,放到烘箱里,100℃活化1h。硅胶面相对,用纸包好,放入干燥器里备用。

1.2.4 展开剂的选择

1.2.4.1 点滴试验法展开剂选择^[10]

在薄层板上点样0.5μl,用移液枪移取30μl展开剂,缓慢的加到样点上,待展开剂挥干后,在紫外灯下观察,选择较为合适的展开剂。

1.2.4.2 一维TLC展开剂的优化

根据点滴试验法展开剂选择的结果,在两个小的层析槽内,分别加入强极性的和弱极性的展开剂,预饱和30min。在2cm×7cm GF₂₅₄硅胶板上点样1μl,点样直径小于3mm。在层析槽内进行线性上行展开,层析结束后取出硅胶板,及时用铅笔标记溶剂前沿,挥干溶剂,在紫外分析仪中观察,拍照,测量R_f值,根据R_f值进行展开剂的调整。

1.2.4.3 二维TLC

根据一维展开剂的摸索的结果,用10cm×10cm GF₂₅₄硅胶板进行二维展开,在两个层析槽内,分别加

入低极性和强极性展开剂, 预饱和 30min, 在薄层板一角距两边 1.5cm 处点样 5 μ l。先在弱极性展开系统中展开, 挥干溶剂, 硅胶板转 90°, 以已一维展开的样品为底边, 再在强极性展开剂中展开, 挥干溶剂, 在紫外分析仪中观察, 拍照。

1.2.5 生物自显影

用 75% 酒精擦拭湿室, 加入浸有甘油溶液的滤纸, 紫外线杀菌 30min。

在超净工作台上, 将展开的硅胶板放置 30min, 完全挥干溶剂。以 0.5 μ l 5% 氯霉素为阳性对照, 点在硅胶板的左下角。紫外线杀菌 30min, 以两种方式向薄层板上涂加培养基和指示菌: 含 0~0.6% 琼脂的半固体肉汤培养基, 以混菌法涂板, 即将含指示菌的半固体肉汤培养基, 分三次涂加到薄层板上, 每次见薄板稍湿即可; 含 0.8%、1% 琼脂的半固体肉汤培养基, 以涂布法涂加指示菌, 即先将已降温至 50℃ 的半固体肉汤培养基, 分三次涂加到薄层板上, 每次见薄板稍湿即可, 待培养基凝固后, 在薄层板滴加 0.2ml 指示菌种子液, 用涂布棒均匀涂布。将覆盖有指示菌培养基的薄层板放在湿室内 36℃ 培养 12~22h, 肉眼观察抑菌斑, 喷加 0.1% TTC, 继续培养, 观察抑菌斑, 拍照。

1.2.6 生物自显影条件的优化

对湿室保湿方法、半固体培养基琼脂含量, 指示菌菌龄, 生物自显影薄层板培养时间, TTC 现色时间等有关生物自显影条件进行单因素优化研究。

2 结果与分析

2.1 展开剂的筛选及生物自显影结果

天然产物成分复杂, 一维薄层色谱必须进行大量的展开剂筛选工作, 才有可能有效分离不同极性的化合物, 二维薄层色谱最大优点就是对于成分复杂的样品, 不必筛选大量的溶剂系统, 对于不同极性物质都有良好的分离效果。根据点滴试验法展开剂选择的结果, 对一维 TLC 展开剂进行优化, 见表 1。选择 R_f 值在 0.1~0.7 范围内的溶剂系统, 为二维展开系统, 即以乙酸乙酯:正己烷(3:7)为弱极性展开系统, 以甲醇:二氯甲烷(1:9)为强极性展开系统。

表 1 一维展开系统优化
Table 1 One-dimension development system optimization

展开剂	R_f 值及现象
乙酸乙酯:正己烷 (1:9)	$R_f=0.12, 0.23$
乙酸乙酯:正己烷 (2:8)	$R_f=0.13, 0.29, 0.42$
乙酸乙酯:正己烷 (3:7)	$R_f=0.27, 0.42, 0.45, 0.75$
甲醇:氯仿 (0.5:9.5)	$R_f=0.03, 0.23, 0.48, 0.55$
甲醇:氯仿 (1:9)	$R_f=0.1, 0.4, 0.52, 0.6, 0.68$
甲醇:氯仿 (2:8)	$R_f=0.3, 0.66, 0.81, 0.88$



图 1 二维薄层色谱
Fig.1 2D- TLC

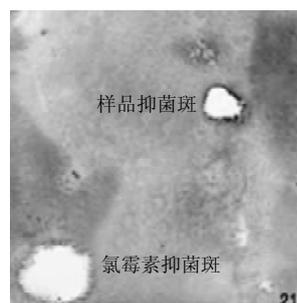


图 2 二维薄层色谱生物自显影
Fig.2 Agar overlay 2D- TLC bioautography

从图 1 可以看出, 二维生物自显影可将粗提物样品较好地分离。生物自显影薄层板培养后, 从薄层板侧面观察可见清晰的抑菌斑, 但正面观察抑菌斑不明显, 这是由于薄层板上培养基很薄, 硅胶板底色亮白所致。为了使抑菌斑更加明显, 更易观察, 向薄层板上喷加 0.1% TTC, TTC 可被活菌细胞内的琥珀酸脱氢酶等呼吸酶还原成不溶性的红色颗粒, 使活细胞显红色, 死细胞不能被染色, 可以准确地鉴别菌体细胞活性^[11-12]。喷加 TTC 的薄层板经一段时间培养后, 细菌生长处呈现红色, 抑菌斑处细菌生长被抑制, 处呈白色背景色, 见图 2。图 2 表明, 喷加 TTC 可使样品中具有抗菌活性的成分和阳性对照氯霉素产生清晰的抑菌斑。

2.2 生物自显影条件的优化

薄层层析生物自显影技术是一个化学分离和微生物生长、显色的复合技术, 使指示菌正常生长, 正常显色是生物自显影的最终目的, 因此必须保证指示菌有合适的生长培养温度和湿度以及指示菌合适的菌龄以正常显色。

2.2.1 保湿方法对生物自显影的影响

细菌生长要求较高的空气湿度, 培养基必须保持湿润状态, 考虑到在 36℃ 条件下, 水分蒸发较快, 薄层板上培养基很薄, 因此, 设计了滤纸上加水、滤纸加 20% 甘油和水等三种湿室保湿方法。从表 2 可以看出, 以浸有 20% 甘油的滤纸铺在湿室内, 在试验期间内培养基可始终保持湿润状态, 显色效果好。

表2 湿室保湿方法对生物自显影的影响
Table 2 Effects of moisturizer on bioautography

保湿效果	水	滤纸上加水	滤纸加 20% 甘油
薄层板	较干	较湿润	湿润
显色效果*	+	++	+++

注：“+++”显色效果好，“++”显色效果较好；“+”显色效果较差，下同。

2.2.2 指示菌菌龄对生物自显影的影响

分别以 6、14 和 22h 菌龄的指示菌种子液进行生物自显影，发现显色时间和显色效果有很大的差别，当使用菌龄 6h 和 22h 的指示菌种子时，薄层板喷加 TTC 后，菌体不能很快显色，且显色不均匀，需要继续培养 4~5h 后才会显色，显色不均一；而使用菌龄为 14h 的指示菌种子时，薄层板可快速显色，且显色均匀，结果见表 3。这是因为菌龄过小的指示菌要想扩增到足以显色的浓度，必须延长薄层板的培养时间，否则菌浓不够；菌龄过长的指示菌，已老化生成芽孢，使用芽孢作为菌种，同样需延长薄层板的培养时间，否则也存在显色时菌浓不够的问题，而它们延长薄层板培养时间，都会造成菌龄不一致，使显色不均匀。

表3 菌龄对生物自显影的影响
Table 3 Effects of indicating strain age on bioautography

菌龄(h)	6	14	22
显色效果	++	+++	++
显色时间(h)	4~5	1~2	4~5

2.2.3 薄层板培养时间对生物自显影的影响

指示菌细胞内琥珀酸脱氢酶等呼吸酶的总活性是薄层板喷加 TTC 后能否快速显色的关键，因此，必须在指示菌数量最大和活性最强时，喷加 TTC，这时指示菌可快速氧化 TTC，从而使薄层板快速均匀地显色。培养 10h 的薄层板上的指示菌总量不足，需边生长边显色，显色时间较长，显色效果不好；培养 22h 的薄层板上的指示菌已处于老化状态，活力下降，显色时间也较长，显色效果不好。从表 4 可以看出，薄层板最适培养时间为 14~18h。

表4 薄层板培养时间对生物自显影的影响
Table 4 Effects of thin layer plate culturing time on bioautography

薄层板培养时间(h)	10	14	18	22
显色效果	+	+++	+++	++
显色时间(h)	5~6	2	1~2	3~4

2.2.4 半固体培养基琼脂含量对生物自显影的影响

从表 5 可以看出，混菌涂板方式，含 0.2%~0.6% 琼脂的半固体培养基都可显现良好的显色效果，不含琼脂的培养基，由于薄层板上不能存留较多的培养基，培

养后，薄层板较干，显色不好，且不加 TTC 之前也不能观察到抑菌斑。对于涂布法，由于含 0.8% 琼脂的半固体培养基较软，不易涂布指示菌，造成显色效果不好，含 1% 琼脂的半固体培养基较硬，便于涂布指示菌，显色效果较好。因此，两种不同的涂板、加指示菌方式的生物自显影都是可行的。

表5 半固体肉汤培养基琼脂含量对生物自显影的影响
Table 5 Effects of agar content of semisolid bouillon culture-medium on bioautography

琼脂含量(%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
显色效果	+	+++	+++	+++	++	+++

3 讨论

行之有效的活性筛选模型是发现新活性化合物的关键，以往从天然产物中筛选抗菌活性成分，首先必须对每一种成分进行分离，然后逐一进行生物活性检测，再决定取舍，工作量很大。当前，这一传统模式已逐渐转向为活性指导下的靶向追踪分离纯化模式，以 96 孔板等微孔板为载体，结合适当模型，可对混合物进行抗菌活性检测，虽然这种方法无法知道是混合物中哪种或哪几种成分具有活性，但通过边分离、边跟踪的办法，可以高通量地逐步筛选到具有活性的粗提样品、活性部位，最终分离到活性成分，是一种快速筛选分离方法。但这种方法也有不足之处，即活性检测始终滞后于分离过程，必须等到检测结果出来后，方能指导下一步分离工作的方向。薄层色谱生物自显影技术弥补了 96 孔板法的不足，它可使样品分离、活性检测、活性成分定位等工作一次完成。它将活性天然产物指纹图谱中化学成分与其抗菌活性联系起来，建立了真正意义上的天然抗菌成分的谱效关系，简化了复杂繁琐的活性成分筛选过程，消除了工作的盲目性。该方法不需要特殊的仪器，操作简单，实验消耗低，适合一般实验室操作。

每次同时展开多块薄层板，一块用于生物自显影，其它经 254nm 紫外观察，用铅笔画出每个斑点，待生物自显影结果出来后，将各类化合物专属性显色剂直接喷在薄层板上，可对活性斑点进行在位检识，初步确定活性成分归属；挖取相应活性斑点，制备活性成分，进行结构分析；根据展开系统，设计活性成分大规模的分离方案。

4 结论

4.1 培养基覆盖二维薄层色谱生物自显影技术是一种简便，快速检测抗菌活性成分方法，由于其薄层板大，溶剂筛选简单，分离效果好，可形成清晰的抑菌斑点，

便于直接进行活性成分分离、检识,比一维薄层色谱生物自显影更适合成分复杂的天然抗菌成分的检测。

4.2 生物自显影显色优化条件为:以乙酸乙酯:正己烷(3:7)为弱极性展开系统,甲醇:二氯甲烷(1:9)为强极性展开系统,用20%甘油滤纸对湿室保湿,以14h菌龄的枯草芽孢杆菌为指示菌种子液,自显影薄层板36℃培养14~18h, TTC显色时间为1~2h,含0.2%~0.6%琼脂的半固体培养基应使用混菌法生物自显影,含1%琼脂半固体培养基应使用涂布法生物自显影。

参考文献:

- [1] CHOMA I, GREND A D, MALINOWSKA I, et al. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method[J]. J Chromatogr B, 1999, 734(1): 7-14.
- [2] RAMIREZ A, GUTIERREZ R, DIAZ G, et al. High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk[J]. J Chromatogr B, 2003, 784(2): 315-322.
- [3] RHEE I K, VAN-DE-MEENT M, INGGANINAN K, et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining[J]. J Chromatogr A, 2001, 915(1/2): 217-223.
- [4] 刘欣,郝淑贤,赵力超,等. 葶苈英抑菌成分活性跟踪方法的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 78-81.
- [5] 邹文欣. 黄花蒿与蒙古蒿内生真菌的研究[D]. 南京: 南京大学, 2000.
- [6] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, et al. Taxol and taxane production by taxomyces and reanal, an endophytic fungus of pacific yew comments[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [7] STROBEL G. Natural products from endophytic microorganisms[J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 257-268.
- [8] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [9] 何佳,陈钧,赵启美,等. 快速筛选金钱松内生真菌抗真菌活性的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1759-1763.
- [10] 何丽一. 平面色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999: 97.
- [11] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 189-190.
- [12] HOLETE F B, PESSINI G L, SANCHES N R, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2002, 97(7): 1027-1030.