

核磁共振技术在枯草芽孢杆菌的抗菌物质结构鉴定中的应用

商伟伟, 蔡 良, 罗 磊, 沈加彬, 施碧红

(福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108)

摘 要: 核磁共振 (NMR) 技术是化合物结构鉴定的一种重要的方法。该文简单介绍了 NMR 技术的基本原理, 及 NMR 技术在枯草芽孢杆菌所产的多肽、脂肽类抗菌物质结构鉴定中的运用概况, 进一步阐述了 NMR 联用技术的发展现状, 展望了其在枯草芽孢杆菌抗菌物的结构鉴定方面的应用前景。

关键词: 核磁共振; 枯草芽孢杆菌; 抗菌物; 结构鉴定

中图分类号: O482.53; Q939.92 **文献标志码:** A

文章编号: 1637-5617 (2012) 01-0067-04

Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in structure identification of antimicrobial components from *Bacillus subtilis*

SHANG Wei-wei, CAI Liang, LUO Lei, SHEN Jia-bin, SHI Bi-hong

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: The nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy technology is one of the important methods in chemical structure identification. In this paper, the basic principle of NMR was introduced, and the applications of NMR for identifying the structures of antibiotic peptides and lipopeptides of *Bacillus subtilis* were summarized. Finally, the progress of NMR combined with other techniques was stated and the application of these combined techniques in identification of new antimicrobial compounds from *Bacillus subtilis* was prospected.

Key words: nuclear magnetic resonance; *Bacillus subtilis*; antibiotic substance; structure identification

枯草芽孢杆菌是被美国食品与药物管理局 (FDA) 及我国农业部正式批准使用的益生菌, 由其产生的结构各异的抗菌物质有几十种, 主要包括由核糖体合成的肽类抗菌物质, 非核糖体合成的脂肽类抗菌物质, 磷脂类, 大环内酯类, 酚类, 多烯类物质等^[1]。经研究其产生的抗菌物质对多种植物病原菌有抑制作用, 能强烈抑制水稻纹枯病菌, 稻瘟病菌, 炭疽病菌等真菌在农作物中的传播, 对绿色农业的发展有很好的促进作用^[2]。随着农业、医学等行业的发展, 人们对其产生的具有抗菌活性的天然产物产生了浓厚的兴趣, 对这些活性成分结构的鉴定亦显得日益重要。

核磁共振技术是天然产物尤其是复杂化合物结构鉴定与分析研究不可缺少的手段, 利用核磁共振

波谱可以方便地提供不同分子结构上的细小差别, 包括同分异构与立体异构化合物。近年来, NMR 被频繁用于枯草芽孢杆菌所产生的抗菌物质的分析与结构鉴定。当然分析鉴定枯草芽孢杆菌抗菌物质的结构需要多种方法结合使用, 并且需要大量的工作和经验, 本文主要从核磁共振技术在其中的应用进行介绍。

1 核磁共振技术的原理

核磁共振 (NMR) 是电磁波与物质相互作用的结果。其原理是: 带有核磁性的原子核有自旋运动产生核磁矩, 在外加高强度磁场的的作用下, 吸收射频辐射, 引起核自旋能级的跃迁产生的波谱即核磁共振波谱。由于分子中不同原子核的化学环境是不

收稿日期: 2011-12-23

作者简介: 商伟伟 (1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物天然产物分离. E-mail: me7010705017@126.com

通讯作者: 施碧红 (1968-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物与生化. E-mail: shibh@fjnu.edu.cn

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2009J01128), 福建省科技重点项目 (2009N0033)

同的,则将会有不同的共振频率,产生不同的共振波谱。记录下来这种波谱即可判断该原子在分子中所处的位置及相对数目,对有机化合物进行结构分析。

在化合物的结构鉴定及分析中最常用的核磁共振技术是一维核磁共振氢谱(^1H -NMR)和碳谱(^{13}C -NMR),一维核磁共振氢谱主要提供化学位移、耦合常数、吸收峰的裂分和积分曲线等。与质子相比, ^{13}C 的化学位移比 ^1H 大得多,谱峰重叠的现象小,碳谱能给出更多的结构信息,对化合物的结构解析很有帮助。二维核磁共振谱的应用使鉴定结构的结果更可靠、客观。二维核磁共振谱又分为同核二维核磁共振谱和异核核磁共振谱。常用的五种二维同核实验包括: COSY、DQF-COSY、TOESY、NOESY (EXSY) 和 ROESY, 异核二维核磁共振谱主要有碳-氢相关谱(HSQC)、异核多量子相关谱(HMQC)、异核多键相关谱(HMBC)。继二维谱之后,20世纪90年代脉冲梯度场(PFG)核磁共振技术的发展与应用,使获得谱线狭窄、高分辨谱图成为可能,为快速、准确得到物质结构信息奠定基础^[3]。

2 核磁共振技术在枯草芽孢杆菌的抗菌物质研究中的应用

关于枯草芽孢杆菌有效抗菌物质的利用与研究主要集中在肽类、脂肽类、磷脂类、大环内酯类、酚类、多烯类物质等,尤其是肽类及脂肽类备受关注^[4-5]。

2.1 在抗菌多肽类物质研究中的应用

抗菌肽是枯草芽孢杆菌所产的一大类的肽类抗菌物质^[6]。由革兰氏阳性菌产生的肽类抗菌物质一般包括三类:未经修饰的肽、含二硫键的肽以及含羊毛硫氨酸的羊毛硫抗生素。羊毛硫抗生素因其含有罕见的羊毛硫氨酸(Lan)和甲基羊毛硫氨酸(MeLan)而受到广泛关注,按照其结构和功能将其分为两类:A型羊毛硫抗生素和B型羊毛硫抗生素^[7]。

Subtilin是由枯草芽孢杆菌产生的典型的A型羊毛硫抗生素,其蛋白结构及相关基因序列已得到了广泛的研究。Subtilin是一种阳离子的,含有5环的细长型的抗菌肽^[8]。据Stein^[9]通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)研究其分子量为3319.56。Chan等^[10]人通过

^1H 2D-NMR技术测得其初级结构是由32个氨基酸组成的抗菌肽,而且通过NMR波谱的分析还发现Subtilin是羊毛硫氨酸组成的带有5个环的灵活的分子。这是首次通过NMR技术获得的枯草芽孢杆菌羊毛硫抗生素的NMR数据,为其他羊毛硫抗生素的结构鉴定及进一步研究多肽类和与之相结合的物质相互作用提供了重要的参考。Christ等^[11]通过研究枯草芽孢杆菌ATCC 6633的自身免疫蛋白SPa I的C末端分子量为 14.9×10^3 序列的 ^1H , ^{15}N , ^{13}C 二维核磁共振信号波谱归属,进一步研究SPa I与SPa I/Subtilin复合体的结构信息,从而在分子水平上了解A型羊毛硫抗生素的自身免疫机制以及与自身免疫蛋白之间的相互作用方式。实际上与Subtilin结构上极为相似的还有由枯草芽孢杆菌A1/3所产的Ericin S(分子量3442)和Ericin A(分子量2986)^[12]。

Subtilosin A是由枯草芽孢杆菌所产的B型羊毛硫抗生素,与A型不同,它是球形的由35个氨基酸组成的大环肽类抗生素。经Marx等^[13]通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)研究其分子量为3399.7。同时,他们为了研究其三维结构,将12 mg Subtilosin溶于300 μL DMSO- d_6 中,进行(^1H , ^{15}N , ^{13}C)的NOESY和TOCSY二维核磁共振波谱实验,最后通过对其NMR波谱数据的分析而确定其三维结构,在分子水平上确定了其分子中非相邻氨基酸之间的内部连接,为后面继续研究分子内的特殊连接提供了参考。

LC1是枯草杆菌A014的分泌物中分离出的一种抗菌多肽,是由47个氨基酸组成的多肽抗生素,具有很强的抗水稻的白叶枯致病菌的抑菌活性,邵承华等^[14]人应用2D-NMR技术研究了LC1的溶液构象,通过分析其DQF-COSY、TOCSY和NOESY等 ^1H -NMR波谱而识别了47个氨基酸残基,进一步分析NOESY波谱中 $d_{\alpha\text{N}}$ 、 d_{NN} 、 $d_{\beta\text{N}}$ 和 $d_{\alpha\alpha}$ 的联系完成了序列专一谱峰归属,分析出LC1的二级结构主要为伸展构象,其中25~31与36~42两个氨基酸肽段构成反平行 β 折叠,并有32~35氨基酸肽段形成的 β 转角相连接,LC1不含或仅含少量 α 螺旋。通过其特殊的氨基酸组成推断LC1的三维结构是一个以Trp23为中心依靠疏水作用稳定的核心和由亲水性残基组成亲水表面。

2.2 在脂肽类抗菌物质研究中的应用

环脂肽是枯草芽孢杆菌所产抗菌物质中的一大类别物质，由亲水的肽片段与亲油的脂肪烃组成，是一类新型的生物表面活性剂。它除了具有良好的降低界面表面张力外，还具有抗真菌^[15]、抗细菌^[16-17]、抗肿瘤^[18]、抗病毒^[19]等生物学功能，在医学上将有良好的应用前景。

芽孢杆菌是最先被发现产生环脂肽表面活性剂的菌株，也是生产环脂肽的主要微生物来源。按环脂肽的结构可以分为两大类：第一类是脂肪酸链直接参与成环，即脂肪酸的羧基与肽链氨基酸的 N-端相连，肽链氨基酸的 C-端与脂肪酸的 β -OH 或者 β -NH₂ 相连而成为环脂肽。第二类即脂肪酸链不参与成环，而是通过自身的羧基与肽链氨基酸的 N-端相连成为另一类环脂肽^[20]。

Surfactin 是由芽孢杆菌产生的脂肽类高效表面活性剂，可使水的表面张力由 72 mN/m 降到 27 mN/m，属第一类抗菌脂肽，也是抗菌脂肽家族中最典型的代表。surfactin 除具有抗真菌和抗细菌能力外，还具有抗癌，抗病毒，溶血等生物学活性^[21]。因此，科学家对环脂肽结构与功能之间的关系非常感兴趣。Bonmatin^[22] 等人使用 2D⁻¹ H-NMR 技术测得了其 [Leu4] surfactin 和 [Ile4] surfactin 的结构（一般的 surfactin 第 4 位为 Val），证明此两种物质的表面活性是普通 surfactin 的两倍，并通过分析其疏水残基在 surfactin 的三维结构模型中的作用确定了结构与功能间的密切关系。

Circulocins 是枯草芽孢杆菌产的第二类抗菌脂肽。具有良好的抗革兰氏阳性菌活性，由于 Circulocins 特别的结构其抗菌机制也不同于一般的抗生素，因此在某种程度上能缓解现在抗生素滥用引起的致病菌的抗药性问题。He 等^[23] 人即使用光谱学方法研究其基本结构：他通过高分辨率傅氏转换离子回旋共振（FTICR）质谱技术确定了 circulocin α 的结构式为 C₄₇ H₄₉ N₉ O₁₀，然后通过¹³ C-NMR 和¹ H-NMR 获得了脂肽中羰基碳，次甲基碳及氨基酸残基中质子的化学移位的大致归属，并利用 2D⁻¹ H-¹ H COSY, TOCSY, ¹ H-¹³ C HMBC 和 HMQC 相关谱技术获得了氨基酸的连接顺序，脂肪酸的位置及连接方式，再联合质谱技术而最终确定了 circulocin α 的基本结构。

3 NMR 联用技术

枯草芽孢杆菌抗菌物质为微生物的天然产物，

种类复杂。一般要进行发酵，分离纯化，浓缩，精制，最后才能进行结构的鉴定。其间过程复杂，损失严重。与 NMR 技术相关的联用技术的出现为解决以上问题带来了福音。

高效液相色谱—核磁共振波谱联用技术（HPLC-NMR）是目前天然产物分析鉴定的新手段^[24]。其优点是可以将 HPLC 分离的化合物直接进行 NMR 测定，NMR 谱图可以提供化合物结构的精确信息，从而解决传统分析方法的一些难题，但是 LC-NMR 联用技术也存在着一些新问题，如 LC 和 NMR 的接口技术难题、溶剂峰抑制、灵敏度很低等。尽管如此该项技术由于可以避免不必要的分离步骤而获得复杂提取物的初步信息，对于复杂成分可以首先获得其成分的新颖性和用途，然后再进行常规分离^[25]。

高效液相色谱—固相萃取—核磁共振（HPLC-SPE-NMR）联用技术的出现则解决了很多 HPLC-NMR 联用技术的难题。该项技术指混合成分经 HPLC 分离，DAD 和 MS 检测记录，固相萃取柱收集吸附，N₂ 气流吹干，然后再由氘代溶剂洗脱进入 NMR 仪进行检测。其优点是被分离组分能得到浓缩而提高灵敏度，也可以免除溶剂峰抑制而获得更高质量的图谱。因此，可以快速识别已知化合物和进行新化合物的结构研究^[25]。枯草芽孢杆菌抗菌物质属于微生物天然产物，种类复杂多样，以上联用技术在枯草芽孢杆菌抗菌物质方面的鉴定尚未见报道，但可想而知其应用前景广阔，NMR 联用技术对天然产物的研究也必将产生重大的影响。

4 展望

由于枯草芽孢杆菌所产抗菌活性成分的复杂性以及 NMR 技术自身的技术特点，枯草芽孢杆菌所产活性物质特别是未知组分的 NMR 鉴定仍然是一份艰难的、富于挑战的工作，加上 NMR 技术的灵敏度较低，远不及质谱，都使得 NMR 的鉴定与图谱的解析增加很多的困难。因此，NMR 联用技术的发展变得更为迫切，尤其是 HPLC-SPE-NMR 联用技术与 HPLC-NMR-MS 联用技术的出现都给枯草芽孢杆菌活性成分的鉴定提供了希望，随着 NMR 技术的快速发展以及国内外研究枯草芽孢杆菌活性成分的研究者的不断地努力，相信一定会有新的成果。

参考文献:

- [1] STEIN T, JOHANN WOLFGANG, MARIE CURIE STR. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56 (4): 845-857.
- [2] 赵新林, 赵思峰. 枯草芽孢杆菌对植物病害生物防治的作用机理 [J]. *湖北农业科学*, 2011, 50 (15): 3025-3028.
- [3] 毛希安. 现代核磁共振实用技术及应用 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000.
- [4] BORIISOVA S A, CIRCELLO B T, ZHANG J K, et al. Biosynthesis of rhizoctinins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 [J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17 (1): 28-37.
- [5] ZEIGLER D R. The genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23: insights into speciation within the *B. subtilis* complex and into the history of *B. subtilis* genetics [J]. *Microbiology*, 2011, 157 (7): 20-33.
- [6] JACK R W, TAGG J R, RAY B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria [J]. *Microbiol Rev*, 1995 (59): 171-200.
- [7] JACK R W, JUNG G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4 (3): 310-317.
- [8] GUDER A, WIEDEMANN I, SAHL H G. Post translationally modified bacteriocins: the lantibiotics [J]. *Biopolymers*, 2000, 55 (1): 62-73.
- [9] STEIN T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22 (8): 1146-1152.
- [10] CHAN W C, BYCROFT B W, MARK L, et al. Sequence-specific resonance assignment and conformational analysis of subtilin by 2D NMR [J]. *FEBS Lett*, 1992, 300 (1): 56-62.
- [11] CHRIST N A, DUCHARDT-FERNER E, DUSTERHUS S, et al. NMR resonance assignment of the autoimmunity protein SpaI from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [J]. *Biomol NMR Assign*, 2011.
- [12] STEIN T, BORCHERT S, BIRGIT CONRAD, et al. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3 [J]. *Bacteriol*, 2002, 184 (6): 1703-1711.
- [13] MARX R, STEIN T, KARL DIETER ENTIAN, et al. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Protein Chem*, 2001, 20 (6): 501-506.
- [14] 邵承华, 朱家鹏, 程源, 等. 新型抗菌多肽 LC1 的 ¹H-NMR 谱峰归属和二级结构分析 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34 (4): 457-462.
- [15] CHEN L, WANG N, WANG X, et al. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10 [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (22): 8822-8827.
- [16] KIM K M, LEE J Y, CHUN KYU KIM, et al. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32 (5): 711-715.
- [17] SRIRAM M I, KALISHWARALAL K, DEEPAK V, et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1 [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 85 (2): 174-181.
- [18] LIU X, TAO X, ZOU A, et al. Effect of themicrobial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane [J]. *Protein & Cell*, 2010, 1 (6): 584-594.
- [19] HUANG X, LU Z, ZHAO H, et al. Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj against pseudorabies virus, porcine parvovirus, newcastle disease virus and infectious bursal disease virus in vitro [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2006, 12 (4): 373-377.
- [20] 唐金山, 高昊, 戴毅, 等. 环脂肽类成分研究进展 [J]. *药学学报*, 2008, 43 (9): 873-883.
- [21] SEYDLOV, SVOBODOV J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications [J]. *Central European Journal of Medicine*, 2008, 3 (2): 123-133.
- [22] BONMATIN J M, LABB H, ISABELLE GRANGEMARD, et al. Production, isolation and characterization of [Leu4]- and [Ile4] surfactins from *Bacillus subtilis* [J]. *Letters in Peptide Science*, 1995, 2 (1): 41-47.
- [23] HE H, KORSHALLA J, CARTER GT, et al. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154 [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57 (7): 1189-1195.
- [24] BOBZIN S C, YANG S, KASTEN T P. LC-NMR: a new tool to expedite the dereplication and identification of natural products [J]. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 25 (6): 342-345.
- [25] EXARCHOU V, KRUCKER M, TERIS A, et al. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis [J]. *Magn Reson Chem*, 2005, 43 (9): 681-687.