

文章编号: 1001-8689(2022)07-0677-05

# 1株发光杆菌*Photorhabdus asymbiotica*的次级代谢产物研究

卢宇<sup>1</sup> 闫璧滢<sup>2</sup> 陈渝川<sup>2</sup> 朱小红<sup>2</sup> 李妍<sup>2</sup> 司书毅<sup>2</sup> 陈明华<sup>2,\*</sup> 袁丽杰<sup>1,\*</sup>

(1 华北理工大学 基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 唐山 063210;

2 中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所以, 北京 100050)

**摘要:** **目的** 研究1株发光杆菌*Photorhabdus asymbiotica*抗革兰阴性菌的活性次级代谢产物。**方法** 以抗革兰阴性菌活性为导向, 采用大孔吸附树脂、MCI柱色谱, 以及反相高效液相色谱等多种分离纯化技术, 利用HR-ESIMS和NMR等波谱学方法, 分离*Photorhabdus asymbiotica*发酵液中的化合物并鉴定其结构。**结果** 从菌株*Photorhabdus asymbiotica*中获得3个次级代谢产物, 并鉴定为darobactin(**1**)、环(*L*-色氨酸-*L*-脯氨酸)(**2**)和环(*L*-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)(**3**)。其中化合物**1**对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌均具有显著的抗菌活性。**结论** 化合物**1**为发光杆菌*Photorhabdus asymbiotica*中主要的抗革兰阴性菌活性化学成分。

**关键词:** 发光杆菌; Darobactin; 肽类; 抗革兰阴性菌活性

**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## Secondary metabolites from a bacterium of *Photorhabdus asymbiotica*

Lu Yu<sup>1</sup>, Yan Bi-ying<sup>2</sup>, Chen Yu-chuan<sup>2</sup>, Zhu Xiao-hong<sup>2</sup>, Li Yan<sup>2</sup>, Si Shu-yi<sup>2</sup>, Chen Ming-hua<sup>2</sup>, and Yuan Li-jie<sup>1</sup>

(1 Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Disease, Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210; 2 Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract Objective** To study the secondary metabolites with anti-Gram-negative bacteria activity produced by a bacterium of *Photorhabdus asymbiotica*. **Methods** The secondary metabolites were isolated from the fermentation of *Photorhabdus asymbiotica* by a variety of chromatographic techniques including macroporous resin, MCI gel, and reverse high performance liquid chromatography. Their structures were identified by HR-ESI-MS, NMR spectral

收稿日期: 2022-06-30

**基金项目:** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费(No. 2021-I2M-1-028); 国家自然科学基金(No. 81302675)和河北省自然科学基金(No. H2021209027)

**作者简介:** 卢宇, 女, 生于1997年, 在读硕士研究生, 主要研究方向为微生物产物化学, E-mail: luyu12121@163.com

\*通讯作者, 陈明华, E-mail: chenminghua@imb.pumc.edu.cn; 袁丽杰, E-mail: yuanlijie1970@163.com



第一作者:

卢宇, 河北北方学院学士, 华北理工大学攻读硕士研究生, 主要开展微生物活性次级代谢产物的研究。



通讯作者: 陈明华, 博士,

副研究员, 硕士生导师, 工作单位: 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所以国家新药(微生物)筛选实验室, 从事特殊生境微生物中新型骨架类天然产物及药源分子的发现和研究。



通讯作者: 袁丽

杰, 华北理工大学基础医学院教授, 硕士研究生导师, 主要从事特殊生态环境药用微生物资源挖掘及其活性成分研究。

analysis, and comparison with the spectral data from literatures. **Results** Three known compounds were identified as darobactin (**1**), cyclo (*L*-Pro-*L*-Phe) (**2**), and cyclo (*L*-Trp-*L*-Pro) (**3**). Compound **1** showed significant antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii* with the MICs values of 1.56~12.5 µg/mL. **Conclusion** Darobactin is the main bioactive component of the bacteria *Photorhabdus asymbiotica*.

**Key words** *Photorhabdus* sp.; Darobactin; Peptide; Anti-Gram-negative bacteria activity

近年来,细菌耐药问题日益严峻。据统计,每年大概有70万人因抗生素耐药死亡,严重威胁着人类的健康<sup>[1]</sup>。2017年,世界卫生组织(WHO)公布了一份抗生素耐药优先病原体清单,其中大多数为革兰阴性细菌病原体<sup>[2]</sup>,这些病原体对人类健康构成巨大威胁。革兰阴性菌相对于革兰阳性菌具有独特的外膜结构,只有少数抗生素能穿透其外膜。因此,对于革兰阴性菌耐药患者可选择的抗生素则更少<sup>[3-4]</sup>。随着抗革兰阴性菌“最后一道防线”——多黏菌素耐药株的出现,临床迫切需要新型抗生素来战胜耐药细菌。

微生物次级代谢产物是抗生素的最大源泉<sup>[5-6]</sup>。昆虫病原线虫共生菌是一种寄生在昆虫病原线虫肠道内的肠杆菌科细菌,主要包括发光杆菌属(*Photorhabdus* sp.)和致病杆菌属(*Xenorhabdus* sp.)<sup>[7]</sup>。昆虫病原线虫共生菌随病原线虫一同进入到昆虫体内,而后共生菌从线虫体内大量释放出来,一方面共生菌产生代谢产物来协助线虫感染宿主昆虫,导致宿主昆虫死亡;另一方面,昆虫死亡后,共生菌还要释放一些抗菌物质来抵御环境微生物的入侵,为线虫的生长繁殖提供营养物质的保障<sup>[8-9]</sup>。因此,通过共生细菌-线虫-昆虫这一特殊的生存关系表明,昆虫病原线虫共生菌的次级代谢产物可能会产生许多具有药用价值,特别是具有抗菌活性的次级代谢产物。

光杆菌属(*Photorhabdus* sp.)的次级代谢产物主要有碳青霉烯类、蛋白和肽类、二苯乙烯衍生物、儿茶酚类的铁载体物质等,其中不乏极具应用潜力的抗菌、抗疟原虫、抗病毒,以及细胞毒性物质等<sup>[10-12]</sup>。研究表明,从*Photorhabdus luminescens*

中分离得到的一种新的环氧化物2-isopropyl-5-(3-phenyl-oxiranyl)-benzo-1,3-diol,对大肠埃希菌、化脓性链球菌、枯草芽胞杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑菌活性, MIC为6.25~12.5 µg/mL<sup>[13]</sup>;从*Photorhabdus temperata*中分离得到的蒽醌类化合物1,3,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone和3,8-dihydroxy-1-methoxy-9,10-anthraquinone,可通过减少IL-6、TNF-α和NO来抑制小鼠小胶质细胞(BV2)中干扰素γ诱导的神经炎症<sup>[14]</sup>。因此,挖掘光杆菌属的次级代谢产物可能会获得创新型药物的先导化合物。

本研究以抗大肠埃希菌活性为导向,对1株发光杆菌属细菌*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950进行了活性成分的分离,从中得到了3个化合物,分别鉴定为darobactin(**1**)、环(*L*-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)(**2**)和环(*L*-色氨酸-*L*-脯氨酸)(**3**)(图1),并对它们进行了抗菌活性测定,发现化合物**1**对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌均具有显著的抗菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器与试剂<sup>[15]</sup>

仪器:核磁共振(NMR)波谱仪(Bruker AVIIIHD-600 MHz,美国Bruker公司);HPLC-MS联用仪(Agilent 1100 series LC/MSD,美国Agilent公司);高效液相色谱仪(Shimadzu LC-20AT,日本Shimadzu公司);旋光测试仪(Autopol IV-T,美国Rudolph Research Analytical);冷却水循环装置(EYELA CA-1116A,上海爱朗仪器有限公司);恒温振荡器(THZ-98C,上海一恒科学仪器有限公司);洁净工作台(BCM-1000A,苏州安泰空气技术有限公司);旋转蒸发仪(BUCHI R-300,瑞士Buchi公司)。

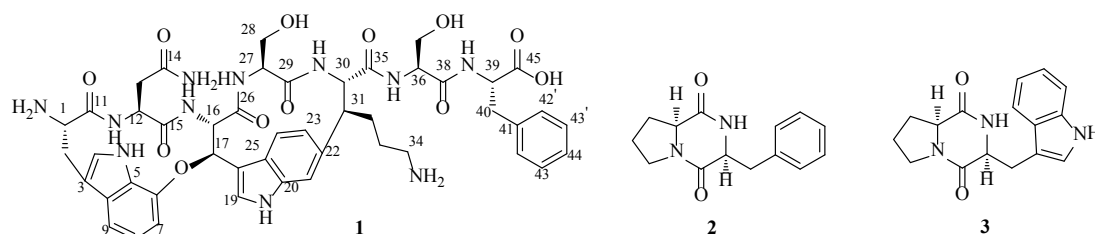


图1 化合物1~3的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1~3

分离填料及试剂：大孔吸附树脂HP-20 (日本Mitsubishi Chemical); ODS-AQ-HG(s-50  $\mu\text{m}$ , 日本YMC公司); 微孔吸附树脂MCI gel (CHP20/P120系列120  $\mu\text{m}$ , 日本Mitsubishi Chemical); 反相 $\text{C}_{18}$ 分析型色谱柱(Capcell Pak AQ, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm, 日本Shiseido Company); 反相 $\text{C}_{18}$ 半制备型色谱柱(Capcell Pak AQ, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm  $\times$  250 mm; Capcell Pak PFP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm  $\times$  250 mm, 日本Shiseido Company); 分析纯乙醇(北京通广精细化工厂); 色谱纯乙腈(上海星可高纯溶剂有限公司); 氘代DMSO(德国Merck公司); 实验用蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

培养基：NB培养基N8300(北京索莱宝科技有限公司); LB肉汤培养基L8291(北京索莱宝科技有限公司); TSB培养基LA0020(北京索莱宝科技有限公司); A2液体培养基(葡萄糖5 g/L、酵母提取物5 g/L、牛肉膏5 g/L、蛋白胨5 g/L、黄豆饼粉10 g/L、玉米浸膏4 g/L、可溶性淀粉20 g/L、 $\text{CaCO}_3$  4 g/L、 $\text{CoCl}_2$  (0.002%) 1 mL, 调节pH至7.2, 121 $^\circ\text{C}$ , 0.1 MPA高压灭菌15 min)。

### 1.1.2 发酵菌株与检定菌

发酵菌株*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950由商城北纳创联生物科技有限公司从美国菌种保藏中心(ATCC)代购。检定菌为大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC19606)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853), 以上菌株均保藏于中国医学科学院医药技术研究所, 国家新药(微生物)筛选实验室。

## 1.2 方法

### 1.2.1 发酵培养基筛选

将保藏的菌株*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950在NB固体培养基上进行复苏, 然后挑取单克隆接种到含有5 mL NB液体培养基的培养管中进行培养, 在对数生长期中, 按照1:100接种到100 mL的锥形瓶中, 每瓶30 mL, 培养基分别为NB、 $\text{A}_2$ 、LB肉汤和TSB液体培养基, 180 r/min进行发酵, 发酵第七天取发酵液10000 r/min, 离心5 min, 留取上清发酵液。选取大肠埃希菌ATCC25922为检定菌(浓度:  $10^5$  CFU/mL), 采用二倍稀释法对4种不同培养基的发酵液进行抗菌活性检测, 首孔发酵液含量为60  $\mu\text{L}$ , 进行10次倍比稀释, 在37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中静置孵

育过夜, 以菌完全不生长判断为具有抗菌活性。

### 1.2.2 菌株发酵

挑取菌株*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950单克隆转接至3个含有100 mL发酵培养基(LB肉汤培养基, 121 $^\circ\text{C}$ , 高压灭菌15 min)的500 mL锥形瓶中, 30 $^\circ\text{C}$ , 180 r/min, 培养24 h, 作为发酵种子液使用。然后进行放大发酵, 准备40个2 L三角瓶, 每瓶加入500 mL发酵培养基, 121 $^\circ\text{C}$ 高压灭菌15 min, 待冷却后使用。每瓶发酵培养基内加入5 mL种子液, 28 $^\circ\text{C}$ , 180 r/min条件下发酵培养7d。

### 1.2.3 分离纯化

将菌株*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950的发酵液进行离心, 6000 r/min, 30 min, 留取上清发酵液。上清发酵液经大孔树脂吸附柱色谱, 依次用去离子水和20%、50%及100%乙醇进行梯度洗脱, 利用HPLC检测, 相似流出组分进行合并, 得到A~D 4个组分。利用大肠埃希菌ATCC25922作为检定菌, 采用二倍稀释法对各个组分进行抗菌活性检测。首孔化合物浓度为1 mg/mL, 进行10次倍比稀释, 在37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中静置孵育过夜, 以菌完全不生长判断为具有抗菌活性。

将具有抗菌活性的C组分用MCI gel按质量比1:1.5拌样, 干法上样, 进行MCI柱色谱, 用10%、20%、40%、60%、80%和100%EtOH进行梯度洗脱, 根据HPLC液相色谱(Capcell Pak AQ 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm; 5%~100% ACN-含0.1% TFA的  $\text{H}_2\text{O}$ 梯度洗脱30 min; 1 mL/min)结果对相似流出组分进行合并, 减压浓缩得到10个亚组分(C1~C10)。根据抗大肠埃希菌活性结果, 接着对亚组分C8进行ODS柱色谱, 用10%、20%、40%、60%、80%和100%EtOH进行梯度洗脱, 根据HPLC液相色谱结果对相似流出组分进行合并, 减压浓缩得到11个组分(C8-1~C8-11)。C8-1经半制备HPLC (Capcell Pak PFP 10 mm  $\times$  250 mm; 17% ACN-含0.1% TFA的  $\text{H}_2\text{O}$ 等度洗脱; 3 mL/min)得到化合物2(4.0 mg)和3(4.0 mg)。C8-2经半制备HPLC (Capcell Pak AQ 10 mm  $\times$  250 mm; 18% ACN-含0.1% TFA的  $\text{H}_2\text{O}$ 等度洗脱; 1.5 mL/min)得到化合物1(17.3 mg)。

### 1.2.4 抗菌活性检测

将化合物1~3分别溶于DMSO, 配置成浓度为10 mg/mL的溶液。采用倍比稀释法对化合物进行4种检定菌最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定。参照CLSI标准<sup>[16]</sup>, 采用



倍比稀释法进行药敏实验。在无菌的96孔板中,加入200  $\mu\text{L}$ 培养体系:LB液体培养基、化合物、待测菌株(浓度:  $10^5$  CFU/mL)。化合物终浓度为:100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.2、0.1和0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养12 h后观察结果,无菌生长孔中所含化合物最小的浓度为MIC,同时设立一线抗G-菌药物多黏菌素作为阳性对照。

## 2 结果

### 2.1 发酵培养基筛选结果

选取NB、A<sub>2</sub>、LB肉汤和TSB液体培养基对菌株*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950进行培养,并在第三天、第五天和第七天进行取样,对发酵上清液进行抗菌活性测定。结果表明,在培养至第七天时, LB肉汤和TSB发酵液分别在发酵液原液稀释6倍和3倍时对大肠埃希菌具有较强的抑制作用,另外两种培养基的发酵液未显示出抗菌活性。因此,本研究选用LB肉汤液体培养基对*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950进行放大发酵。

### 2.2 结构鉴定及波谱数据

化合物**1**为白色无定形粉末,易溶于水和甲醇,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -72$  (c 0.4, MeOH)。 (+)-HR-ESI-MS  $m/z$  966.4390  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 483.7066  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , 分子式为 $\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ 。  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (1H, m, H-1), 3.57 (1H, dd, H-2a), 3.38 (1H, overlap, H-2b, 12), 7.22~7.35 (8H, overlap, H-4, 7, 9, 21, 42, 42', 43, 43'), 7.16 (1H, m, H-8), 2.07 (1H, dd,  $J=13.2$ , 7.8 Hz, H-13a), 1.98 (1H, dd,  $J=13.2$ , 10.0 Hz, H-13b), 5.98 (1H, brs, H-17), 7.87 (1H, brs, H-19), 6.96 (1H, d,  $J=13.2$ , 10.0 Hz, H-13b), 6.83 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-23), 7.44 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-24), 4.02 (1H, m, H-27), 3.24-3.28 (3H, m, H-28, 40a), 4.17 (1H, t,  $J=10.2$  Hz, H-30), 3.03 (1H, m, H-31), 2.04 (2H, m, H-32), 1.87 (1H, m, H-33a), 1.74 (1H, m, H-33b), 2.96 (2H, m, H-34), 4.46 (2H, m, H-36, 39), 3.87 (2H, m, H-37), 3.06 (1H, m, H-40b);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  173.0 (C-14, C-15), 171.3 (C-35, C-38), 170.4 (C-29), 170.2 (C-26), 146.0 (C-6), 137.6 (C-20, C-41), 137.0 (C-22), 132.9 (C-20), 129.6 (C-42, C-42', C-44), 128.5 (C-43, C-43'), 129.4 (C-3, C-5), 128.6 (C-25), 126.8 (C-4, C-23), 125.2 (C-19), 119.2 (C-24), 116.7 (C-9), 112.9 (C-18), 112.0 (C-7), 110.4 (C-3), 75.8 (C-17), 63.2 (C-16), 62.5 (C-28), 61.9 (C-30), 60.5 (C-37), 55.7 (C-39), 54.0 (C-1), 53.9 (C-12), 49.1 (C-31), 37.0 (C-40), 26.5

(C-2), 25.7 (C-32, C-33)。以上数据与文献[17]中数据对照基本一致,故鉴定该化合物为darobactin。

化合物**2**为白色无定形粉末, ESI-MS  $m/z$  245  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 。  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  3.26 (1H, m, H-3a), 3.38 (1H, m, H-3b), 1.72 (2H, m, H-4), 2.00 (1H, m, H-5a), 1.41 (1H, m, H-5b), 4.06 (1H, dd,  $J=7.8$ , 6.0 Hz, H-6), 4.34 (1H, t,  $J=5.4$  Hz, H-9), 3.01 (1H, dd,  $J=5.4$ , 14.4 Hz, H-10), 3.06 (1H, dd,  $J=5.4$ , 14.4 Hz, H-10a), 7.18 (1H, m, Ar-H-4), 7.23~7.27 (4H, m, Ar-H-2, 3, 5, 6), 7.97 (1H, s, -NH);  $^{13}\text{C}$  NMR(150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  165.0 (C-1), 44.6 (C-3), 21.9 (C-4), 27.8 (C-5), 58.4 (C-6), 169.0 (C-7), 55.8 (C-9), 35.3 (C-10), 137.2 (Ar-C-1), 129.8 (Ar-C-2, 6), 127.9 (Ar-C-3, 5), 126.3 (Ar-C-4)。以上数据与文献[18]中数据对照基本一致,故鉴定该化合物为环(L-脯氨酸-L-苯丙氨酸)。

化合物**3**为白色无定形粉末。 ESI-MS  $m/z$  284  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ 。  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  3.37 (1H, m, H-3a), 3.25 (1H, m, H-3b), 1.67 (1H, m, H-4a), 1.97 (1H, m, H-4b), 1.38 (1H, m, H-5a), 1.61 (1H, m, H-5b), 4.05 (1H, dd,  $J=9.6$ , 6.6 Hz, H-6), 4.29 (1H, brt,  $J=4.8$  Hz, H-9), 3.08 (1H, dd,  $J=15.0$ , 6.0 Hz, H-10a), 3.23 (1H, m, H-10b), 7.16 (1H, brd,  $J=2.4$  Hz, H-2'), 7.56 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.95 (1H, t,  $J=7.8$  Hz, H-6'), 7.04 (1H, t,  $J=7.8$  Hz, H-7'), 7.31 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-8'), 7.71 (1H, s, 8-NH), 10.85 (1H, s, 1'-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR(150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  165.5 (C-1), 44.6 (C-3), 27.7 (C-4), 21.9 (C-5), 58.4 (C-6), 169.0 (C-7), 55.2 (C-9), 25.8 (C-10), 124.4 (C-2'), 109.3 (C-3'), 127.3 (C-4'), 118.6 (C-5'), 118.2 (C-6'), 120.9 (C-7'), 111.2 (C-8'), 136.0 (C-9')。以上数据与文献[19]中数据对照基本一致,故鉴定该化合物为环(L-色氨酸-L-脯氨酸)。

### 2.3 化合物**1**~**3**抗菌活性测定结果

化合物**1**对4种检定菌均具有较强的抗菌活性,对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌的MIC值分别为1.56、3.125、12.5和50  $\mu\text{g/mL}$ ; 化合物**2**和**3**在100  $\mu\text{g/mL}$ 时对4种检定菌均未表现出抑制作用。阳性对照药多黏菌素对4种检定菌的MIC值分别为0.06、0.5、0.25和1  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 3 讨论

本研究以抗大肠埃希菌活性为导向,从一株发光杆菌属细菌*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950

的发酵液中获得3个化合物。其中化合物darobactin(**1**)对4株革兰阴性菌均显示出显著的抑制作用。化合物**1**在2019年首次被发现,是一个W<sup>1</sup>-N<sup>2</sup>-W<sup>3</sup>-S<sup>4</sup>-K<sup>5</sup>-S<sup>6</sup>-F<sup>7</sup>氨基酸序列的七肽,并且具有2个独特的大环,其中1个由W<sup>1</sup>咪唑基团的C-7与W<sup>3</sup>的C-β通过1个醚键形成1个十五元环,另一个则由W<sup>3</sup>中咪唑的C-6与K<sup>5</sup>的C-β通过C-C键形成1个十四元环,其中W<sup>3</sup>和K<sup>5</sup>之间碳-碳键连接为自然界首次发现<sup>[17]</sup>。作用机制研究表明,darobactin靶向于外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)中的β-桶状蛋白折叠组装辅助因子脂蛋白A(β-barrel assembly machine A protein, BamA)<sup>[20]</sup>,通过与BamA蛋白结合,稳定了BamA的侧向关闭状态,BamA的信号结合位点被阻断,同源底物的结合被抑制,使得新生的OMPs无法插入外膜而抑制外膜的形成,导致菌体的死亡<sup>[21]</sup>。该化合物能够选择性抑制革兰阴性菌,在体外和体内均具有较强的活性,且毒性较小,是近两年来抗生素研究的一个热点分子。本研究从*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43950中发现了抗革兰阴性菌活性的darobactin,丰富了该化合物的来源,也验证了darobactin具有显著的抗革兰阴性菌的活性,同时也为充分开发利用昆虫病原线虫共生菌的次级代谢产物,寻找新型抗生素先导化合物提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence[J]. *J Mol Evol*, 2020, 88(1): 26-40.
- [2] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318-327.
- [3] Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?[J]. *GMS Hyg Infect Control*, 2017, 12: 1-24.
- [4] Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it[J]. *Molecules*, 2020, 25(6):1340.
- [5] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770-803.
- [6] Nadeem S F, Gohar U F, Tahir S F, et al. Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(5): 578-599.
- [7] 王杰, 戴康, 孔祥鑫, 等. 昆虫病原线虫与环境生物、非生物因素关系的研究进展[J]. *环境昆虫学报*, 2021, 43(4): 811-839.
- [8] Crawford J M, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(27): 7559-7566.
- [9] Tobias N J, Shi Y M, Bode H B. Refining the natural product repertoire in Entomopathogenic bacteria[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(10): 833-840.
- [10] Parihar R D, Dhiman U, Bhushan A, et al. *Heterorhabdus* and *Photorhabdus* symbiosis: A natural mine of bioactive compounds[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 790339.
- [11] Bozhuyuk K A J, Zhou Q, Engel Y, et al. Natural products from *Photorhabdus* and other entomopathogenic bacteria[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 402: 55-79.
- [12] 肖尧, 杨秀芬, 杨怀文. 致病杆菌和发光杆菌抗菌代谢产物研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(4): 553-558.
- [13] Hu K, Li J, Li B, et al. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae)[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(13): 4677-4681.
- [14] Theodore C M, King J B, You J, et al. Production of cytotoxic glidobactins/luminmycins by *Photorhabdus asymbiotica* in liquid media and live crickets[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(11): 2007-2011.
- [15] 肖同美, 毛梦佳, 雷丽娟, 等. 多枝桤柳内生真菌 *Talaromyces stollii* 的次级代谢产物研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(5): 474-480.
- [16] 马越, 李景云, 金少鸿. 美国临床试验室标准委员会推荐药敏试验操作方法和判断标准(2005)[J]. *中华医学杂志*, 2005, 185(17): 1182-1184.
- [17] Imai Y, Meyer K J, Iinishi A, et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens[J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 459-464.
- [18] 丁广治, 刘云宝, 马双刚, 等. 格木内生真菌烟曲霉的代谢产物[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(20): 3083-3085.
- [19] 汪蕾, 胡圣璋, 刘呈雄, 等. 共生真菌巴西类壳小圆孢中环二肽类代谢产物研究[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(9): 1478-1482.
- [20] Kononova A, Kahne D E, Silhavy T J. Outer membrane biogenesis[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 539-556.
- [21] Kaur H, Jakob R P, Marzinek J K, et al. The antibiotic darobactin mimics a beta-strand to inhibit outer membrane insertase[J]. *Nature*, 2021, 593(7857): 125-129.