



研究报告

Research Report

炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 对嗜根考克氏菌肽聚糖合成的影响及其机理

陈鹏[✉], 黄运红[✉], 李非[✉], 李素珍[✉], 龙中儿[✉]

江西师范大学生命科学院, 南昌, 330022

[✉] 通讯作者, longzhonger@163.com; [✉] 作者

分子植物育种, 2016年, 第14卷, 第12篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0012

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

陈鹏等, 2016, 炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 对嗜根考克氏菌肽聚糖合成的影响及其机理, 分子植物育种(online), 14(12): 1080-1086 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0012)

引用格式(英文):

Chen et al., 2016, The effect and its mechanism of the nucleoside antibiotics JX from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 on biosynthesis of peptidoglycan in *Kocuria rhizophila*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(12): 1080-1086 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0012)

摘要 为了揭示一株具有广谱抗菌活性炭样小单孢菌 JXNU-1 产的核苷类抗生素 JX 对嗜根考克氏菌肽聚糖合成的影响, 本研究采用超声破壁、称重法研究抗生素对嗜根考克氏菌细胞壁含量变化, 采用 iTRAQ 技术对抗生素处理前、后嗜根考克氏菌的蛋白质组进行比较分析。结果显示, 在抗生素 JX 作用下, 嗜根考克氏菌细胞分裂被抑制, 细胞壁含量升高; iTRAQ 技术鉴定了抗生素胁迫下的嗜根考克氏菌细胞中的 1780 个蛋白, 其中差异表达蛋白 149 个, 包括表达上调蛋白 106 个, 表达下调蛋白 43 个, 上调表达蛋白中包括有一与肽聚糖合成的相关酶 MurG。本研究为揭示炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 的抗菌作用机制提供了基础数据。

关键词 炭样小单孢菌, 嗜根考克氏菌, 肽聚糖, 定量蛋白质组学, 同位素标记相对和绝对定量技术

The effect and its mechanism of the nucleoside antibiotics JX from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 on biosynthesis of peptidoglycan in *Kocuria rhizophila*

Chen Peng[✉], Huang Yunhong[✉], Li Fei[✉], Li Suzhen[✉], Long Zhonger[✉]

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, 330022

[✉] Corresponding author, longzhonger@163.com; [✉] Authors

Abstract In order to reveal nucleoside antibiotics JX produced by a strain of *Micromonospora carbonaceous* JX-1, which have broad spectrum of antimicrobial activity, had effect on peptidoglycan synthesis of *Kocuria rhizophila*, this research used ultrasound and weighing method to observe the change of content of cell wall in *K. rhizophila* under the effect of antibiotics. We used isobaric tags for relative and absolute quantization (iTRAQ) to analyze the proteomics of *K. rhizophila* before or after the treatment of antibiotics. Result showed that the cell division of *K. rhizophila* was inhibited, and the content of cell wall of *K. rhizophila* was increased under the influence of antibiotics JX. Based on iTRAQ, 1780 proteins were identified in the cell of *K. rhizophila* under the stress of antibiotics. Among them, 149 were differential expression protein, including 106 proteins up-regulated and 43 proteins down-regulated. The up-regulated proteins contained the enzyme Murg which involved in the biosynthesis of peptidoglycan. This research provided the basic data about antimicrobial mechanisms of the antibiotics JX from *M. carbonacea* JXNU-1.

Keywords *Micromonospora carbonacea*, *Kocuria rhizophila*, Peptidoglycan, Quantitative proteomic, Isobaric tags for relative and absolute quantitation

收稿日期: 2016年04月22日

接受日期: 2016年05月25日

发表日期: 2016年05月28日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31160029, 31360018)和江西省自然科学基金项目(20132BAB204007)共同资助

研究背景

炭样小单孢菌(*Micromonospora carbonacea*), 在分类学上属于小单孢菌属(Buchanan and Gibbons, 1984)。研究发现, 炭样小单孢菌产生的次级代谢产物具有抗菌、抗肿瘤及免疫调节等多种生物活性(Sanders and Sanders, 1974; 江红等, 2007), 因而受



到国内外学者广泛关注。

本实验室在前期研究中获得一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1(*M. carbonacea* JXNU-1), 其发酵产物对革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌均具有很强的抗菌活性(龙中儿等, 2008a; 戴菲等, 2011; 彭伟梦等, 2013)。同时, 研究了炭样小单孢菌 JXNU-1 发酵产抗生素的工艺, 掌握了该菌发酵产抗生素的条件及其作用规律(朱跃进等, 2006)建立了从该菌发酵液中分离纯化抗生素的方法, 该抗生素经初步分析确定为一核苷类抗生素(龙中儿等, 2008b) (本研究将其定名为抗生素 JX), 与文献报道的炭样小单孢菌活性产物明显不同, 但其抗菌机理仍不清楚。

嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*), 原名藤黄微球菌(ATCC9341), 是药敏实验的常用靶菌之一(Tang and Gillevet, 2003)。本研究以抗生素 JX 为研究对象, 以嗜根考克氏菌为靶菌, 研究抗生素 JX 对嗜根考克氏菌肽聚糖合成的影响, 同时运用同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术与纳升液相色谱和串联质谱(Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Nano LC-MS/MS)技术高通量地筛选与肽聚糖合成相关的差异表达蛋白, 并应用实时荧光定量-PCR 进行验证, 为揭示抗生素 JX 的抗菌机理提供实验依据, 对炭样小单孢菌抗生素的研发具有重要意义。

1 结果与分析

1.1 抗生素 JX 作用下嗜根考克氏菌的细胞形态

最低抑菌浓度是测量抗菌药物抗菌活性大小的一个指标, 试管二倍稀释法是测定抗菌药物最低抑菌浓度的一种常见方法。本研究首先运用试管二倍稀释法分析了抗生素 JX 对嗜根考克氏菌的最低抑菌浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)为 3.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后考察了嗜根考克氏菌在最低抑菌浓度的抗生素 JX 作用下的细胞形态, 在抗生素 JX 作用下, 嗜根考克氏菌的细胞体积明显增大(图 1)。

1.2 抗生素 JX 对嗜根考克氏菌细胞壁含量的影响

实验分析了嗜根考克氏菌分别在 0、1/2MIC、4/5MIC 和 MIC 的抗生素 JX 作用下的细胞壁含量变化, 发现在一定的抗生素 JX 浓度范围内, 嗜根考克氏菌细胞壁的含量随抗生素 JX 作用浓度增加而呈现上升趋势, 当抗生素 JX 浓度达到 MIC 时, 嗜根考克氏菌细胞壁含量比对照组细胞壁增加了 76.5%(图 2)。

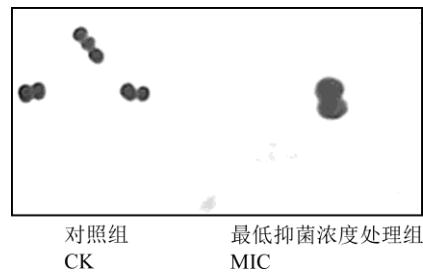


图 1 炭样小单孢菌抗生素 JX 对嗜根考克氏菌细胞形态的影响($\times 5000$)

Figure 1 Effect of the antibiotics JX from *M. carbonacea* JXNU-1 on morphology of *K. rhizophila* ($\times 5000$)

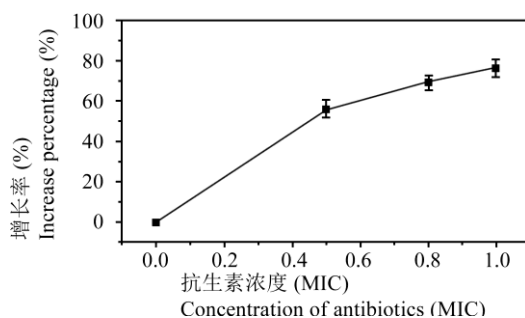


图 2 抗生素 JX 对嗜根考克氏菌细胞壁合成的影响

Figure 2 Effect of the antibiotics on cell wall synthesis of *K. rhizophila*

1.3 菌体蛋白的提取与鉴定

本研究使用 iTRAQ 技术进行蛋白质相对定量, 所用质谱仪器是 Triple TOF 5600。在本次实验中共得到 327 366 张谱图, 采用 Mascot 软件进行分析, 匹配到 77 809 张谱图, 其中 70 346 张是 Unique 谱图, 鉴定到的蛋白计 1 780 个, 13 420 个肽段, 其中含有 12 178 个 Unique 肽段。

1.4 差异表达蛋白的筛选

用 iTRAQ 技术对蛋白进行相对定量时, 当某一蛋白质的丰度差异倍数大于 1.2 倍、同时假设检验($p \leq 0.05$), 则定义该蛋白是不同样品间的差异蛋白。而当某一蛋白质的量在两样品间无显著变化, 那么该蛋白质丰度接近于 1。本研究对上述鉴定到的 1 780 个蛋白的差异倍数以 2 为底取对数, 然后做出分布图(图 3), 居于横坐标 0 右侧为表达量上调的蛋白, 居于横坐标 0 的左侧为表达量下调的蛋白。设定差异表达蛋白的筛选条件为在 2 次重复中至少有 1 次重复满足差异倍数(≥ 1.2 或者 ≤ 0.833)和统计显著性($p \leq 0.05$), 并且在剩余的重复中表达趋势保持一致, 得到差异表达蛋白质共 149 个($P \leq 0.05$), 其中, 表达上调蛋白 106 个(上调倍数 ≥ 1.20 , $P \leq 0.05$),

表达下调蛋白 43 个(上调倍数 ≤ 0.833 , $P \leq 0.05$)。

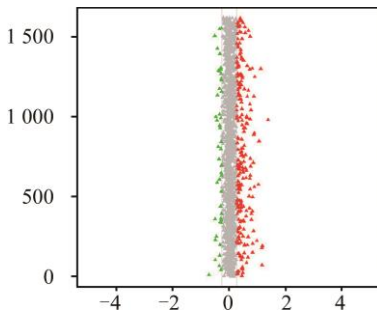


图3 嗜根考克氏菌蛋白质丰度分布
Figure 3 Distribution of protein abundance in *K. rhizophila*

1.5 差异表达蛋白的 GO 功能显著性富集分析

差异表达蛋白的 GO 功能显著性富集分析给出差异表达蛋白与哪些生物学功能显著相关。在筛选到的 149 个差异蛋白中, 9 个显著性富集为细胞组件(Cellular component), 66 个显著性富集为分子功能(Molecular function), 47 个显著性富集为生物学途径(Biological process) (表 1)。根据 GO 功能显著性富集分析可知, 发现一个与细菌细胞壁肽聚糖合成相关的上调蛋白 MurG (Accession: gi|752628268|ref|WP_041297629.1|), 其上调倍数为 1.224。

1.6 差异表达蛋白的 RT-PCR 验证

选择 16S rRNA 为内参基因, 采用 RT-PCR 技术分析了抗生素 JX 作用下嗜根考克氏菌细胞壁肽聚糖合成相关的 MurG 蛋白 mRNA 表达水平。在抗生素 JX 作用下, 嗜根考克氏菌 MurG 的 mRNA 相对表达含量为 16.56, 大于 1。

2 讨论

核苷类抗生素根据其结构的不同, 可以分为碱基类似物、简单核苷类、酰基核苷类、糖基核苷类、核苷酸类等, 其中糖基核苷类抗生素、结构复杂的酰基核苷类通常影响细胞壁多糖、蛋白质等各种生物大分子的合成, 或者影响细胞的分裂, 而结构简单核苷类抗生素、简单的碱基类似物可能影响核酸的合成(Sino, 1988; Rachakonda and Cartee, 2004; Winn et al., 2010; Isono, 1991)。本研究研究的炭样小单孢菌 JXNU-1 所产抗生素 JX 经初步分析为一核苷类抗生素, 从抗生素 JX 作用下的嗜根考克氏菌细胞形态来看(图 1), 抗生素 JX 抑制了嗜根考克氏菌的细胞分裂; 与此同时, 实验发现, 抗生素 JX 作用下的嗜根考克氏菌细胞的细胞壁含量升高, 应

该说这是一个值得进一步研究的发现。

iTRAQ 技术与传统双向凝胶电泳相比, 具有分辨率高、重复性好的优点, 它可以鉴定任何类型的蛋白质, 并且可同时定量多达 8 个样品。本研究采用 iTRAQ 技术对抗生素胁迫下嗜根考克氏菌的蛋白质组进行分析, 从蛋白质组学角度揭示炭样小单孢菌 JXNU-1 所产核苷类抗生素 JX 对嗜根考克氏菌细胞壁合成影响。在抗生素 JX 作用下, 嗜根考克氏菌细胞中有 149 个蛋白发生差异表达, 其中 106 个表达上调, 43 个表达下调蛋白。在上调蛋白中发现一个和细菌细胞壁肽聚糖合成相关的蛋白 MurG(Accession:gi|752628268|ref|WP_041297629.1|), 其上调倍数为 1.224, 这一结果通过实时荧光定量 PCR 得到印证。

细菌细胞壁主要成分是肽聚糖, 它能够保护细菌免受外来物质侵扰(Koch, 2003), 同时是很多药物的靶标。肽聚糖的生物合成过程, 根据其在细菌中的功能区域不同, 可分为三个阶段(Silver, 2006), 第一个阶段在细胞质中进行, 合成 UDP-NAMA-五肽; 第二阶段在细胞膜上进行, 包括 NAG 与 NAMA-五肽结合形成肽聚糖单体以及类脂载体的再生; 第三阶段在细胞壁上进行, 肽聚糖链通过肽链间的连结发生交联(武大雷和沈旭, 2008)。本研究采用 iTRAQ 技术分析获得一个参与细胞壁肽聚糖合成的差异表达蛋白 MurG, 该蛋白被鉴定为上调蛋白。在炭样小单孢菌 JXNU-1 所产核苷类抗生素 JX 作用下, 细胞壁肽聚糖合成相关基因 murG 大量表达, 从而导致肽聚糖大量生物合成, 细胞壁含量增加。另外有文献报道, MurG 与细胞分裂有关, 对细胞形态也有影响(Tamimount et al., 2007; Gupta et al., 2015)。但有关炭样小单孢菌 JXNU-1 所产核苷类抗生素 JX 如何促进 MurG 表达, 及相互作用的分子机制还不清楚。

总结以上, 可以认为, 炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 通过抑制嗜根考克氏菌的细胞分裂而抑制细菌的生长, 同时, 嗜根考克氏菌在抗生素 JX 的作用下通过促进细胞壁的合成以阻止抗生素 JX 进入细胞, 达到保护自身细胞的作用。当然, 这一现象是否具有普遍性, 以及嗜根考克氏菌在抗生素 JX 的作用下如何促进 MurG 的表达, 进而促进细胞肽聚糖的合成还有待于进一步研究。



表 1 差异蛋白的 GO 功能显著性富集分析
 Table 1 Significant enrichment analysis of Go function of differential proteins

	GO 条目 Gene Ontology term	次数 Frequency
细胞组成 Cellular component	细胞质基质 Cytosol	3
	细胞壁 Cell wall	2
	外部封装结构 External encapsulating structure	2
	胞浆部分 Cytosolic part	2
分子功能 Molecular function	NAD ⁺ 合酶 (谷氨酰胺水解) NAD ⁺ synthase (glutamine-hydrolyzing) activity	2
	3-羟基异丁酸脱氢酶 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase activity	2
	NAD ⁺ 合酶 NAD ⁺ synthase activity	2
	肌氨酸氧化酶 Sarcosine oxidase activity	2
	氧化还原酶, 作用于供体 CH-NH, 氧作为受体 Oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors, oxygen as acceptor	2
	氧化还原酶 Oxidoreductase activity	26
	丝氨酸型肽酶 Serine-type peptidase activity	4
	丝氨酸水解酶 Serine hydrolase activity	4
	黄素腺嘌呤二核苷酸结合 Flavin adenine dinucleotide binding	5
	丝氨酸型肽链内切酶 Serine-type endopeptidase activity	3
	3-甲基-2-氧桥丁酸脱氢酶(2-甲基丙酮酸转移) 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) activity	2
	酰基辅酶 A 脱氢酶 Acyl-CoA dehydrogenase activity	2
	磷酸葡萄糖酸脱氢酶(脱羧基) Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity	2
	氧化还原酶, 作用于供体 CH-CH Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	5
	负离子跨膜运输 Anion transmembrane transporter activity	3
生物进程 Biological process	支链氨基酸代谢进程 Branched-chain amino acid metabolic process	4
	烟酰胺核苷酸代谢进程 Nicotinamide nucleotide metabolic process	4
	氧化还原进程 Oxidation-reduction process	25
	氧化还原辅酶代谢进程 Oxidoreduction coenzyme metabolic process	4
	吡啶核苷酸代谢进程 Pyridine nucleotide metabolic process	4
	含吡啶化合物代谢进程 Pyridine-containing compound metabolic process	4
	缬氨酸代谢进程 Valine metabolic process	2



3 材料和方法

3.1 菌株

炭样小单孢菌 JXNU-1 (*M. carbonacea* JXNU-1) 由江西师范大学生命科学学院提供; 嗜根考克氏菌 (*K. rhizophila*) 由江西师范大学生命科学学院提供。

3.2 培养基和主要试剂

NB 肉汤培养基购自杭州微生物试剂有限公司, 高氏 I 号培养基制备参见文献(李瑾等, 2013), 种子培养基和发酵培养基制备参见文献(李瑾等, 2013)。iTRAQ8 标记试剂盒与 Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB) 购自 ABI 公司; 胰蛋白酶 (Trypsin) 购自 sigma 公司; 2-D Quant Kit 购自 GE Healthcare 公司。

3.3 炭样小单孢菌的发酵培养与抗生素溶液的制备

参照文献(龙中儿等, 2008b)的方法进行: 将发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 去沉淀, 上清用新华滤纸过滤, 用量筒量取滤液后, 加入两倍体积的无水乙醇, 在 4℃ 冰箱沉淀 4 h, 然后 4 000 r/min 离心 15 min, 把上清 pH 调成 7.0, 用旋转蒸发器除去酒精, 加蒸馏水恢复原发酵液的体积, 测浓度为 117.5 ug/mL, 用针孔式过滤器过滤除菌, 并验证过滤除菌的方法有效, 4℃ 冰箱保存备用。

3.4 抗生素对嗜根考克氏菌及其细胞壁合成的影响

测定抗生素 JX 对细菌细胞壁含量的影响(彭伟梦, 2010): 配制含不同浓度抗生素 JX 的 NB 培养基 50 mL, 接入嗜根考克氏菌菌悬液, 使嗜根考克氏菌的终浓度为 105 cfu/mL, 200 r/min、37℃ 振荡培养 12 h, 显微观察抗生素 JX 作用下的嗜根考克氏菌体形态, 发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 倒掉上清, 离心管壁上残留的水分用吸水纸吸干, 称取相同质量的湿菌体, 并向管中加入相同体积的蒸馏水, 重悬后, 超声破壁(间歇 5 s, 工作 3 s, 共 20 min), 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 10 000 ×g 离心 20 min, 倒掉上清, 收集沉淀即细胞壁碎片, 比较抗生素作用下细菌细胞壁含量的变化。每试验重复三次, 取其平均值。

3.5 抗生素对嗜根考克氏菌蛋白质表达的影响

3.5.1 样品的处理

配制含不同浓度抗生素 JX 的 NB 肉汤培养基 50 mL, 设不加抗生素 JX 的 NB 肉汤培养基为对照组, 分别接入嗜根考克氏菌菌悬液, 使嗜根考克氏菌的终浓度为 105 cfu/mL, 200 r/min、37℃ 培养

12 h。将培养物置于 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 收集菌体样品。

3.5.2 蛋白质的提取

蛋白质的提取(马良宏等, 2015): 分别称取相同质量的菌体样品, 然后用蛋白裂解液溶解, 之后分别加入终浓度为 2 mm 的 EDTA, 1 mm 的 PMSF, 5 min 后, 加 DTT 至终浓度为 10 mm, 超声破碎 15 min 后, 25 000 g 下离心 20 min, 取上清液, 然后加 5 倍体积预冷过的丙酮, 于 -20℃ 静置 2 h, 再用 16 000 g 离心 20 min, 倒掉上清液, 收集沉淀, 添加一定量的蛋白裂解液溶解, 之后分别加入终浓度为 2 mm 的 EDTA, 1 mm 的 PMSF, 5 min 后, 加 DTT 至终浓度为 10 mm, 超声破碎 15 min 后, 25 000 g 下离心 20 min, 取上清液, 添加 DTT 至终浓度为 10 mm, 56℃ 处理 1 h, 还原二硫键, 然后加入 IAM 至终浓度为 55 mm, 暗室静置 45 min, 加适量预冷过的丙酮, -20℃ 沉淀 2 h, 25 000 ×g 离心 20 min, 倒掉上清液, 加入 200 μL 0.5 M TEAB, 超声溶解 15 min, 25 000 ×g 离心 20 min, 取上清, -80℃ 保存备用。Bradford 定量并用 12% SDS-PAGE 检测总蛋白提取质量。

3.5.3 嗜根考克氏菌的差异蛋白组学分析

蛋白质 iTRAQ 标记(马良宏等, 2015): 取 100 μg 蛋白质样品, 加入适量胰蛋白酶(蛋白: 酶=20:1), 37℃ 条件下酶解 4 h, 照上面的比例再加一次胰蛋白酶, 37℃ 条件下酶解 8 h, 利用真空离心泵抽干肽段, 用 0.5 M TEAB 再次溶解肽段, 然后开始 iTRAQ 标记, 不同组肽段用不同的 iTRAQ 标签来标记, 在室温条件下培养 2 h, 把标记过的各组肽段混匀, 通过 SCX 柱完成液相分离, 最后进行 Nano LC-MS/MS 分析。质谱数据经 Data Analysis 4.0 软件自动分析标峰得到 mgf 文件, 利用 Mascot2.3.02 软件搜索数据库 *K. rhizophila*-NCBI (6 362 sequences) 进行蛋白质鉴定, 肽段匹配误差控制在 0.05 Da 以下。然后, 利用 iTRAQ 定量的 ratio 值(抗生素处理组与对照组表达量比值的四个 ratio 值的平均值)和单样本 t 检验的 P 值, 选出差异表达蛋白, 其中差异蛋白筛选条件为: 在 2 次重复中至少有 1 次重复中满足差异倍数(≥1.2 或者 ≤0.833)和统计显著性 (p≤0.05), 并且在剩余的重复中表达趋势保持一致。最后, 利用 Blast2GO 程序对分析得到蛋白分别进行 GO(基因本体论)、COG(直系同源簇)、KEGG(京



都基因与基因百科全书)注释, 得到蛋白的功能信息。

3.6 差异表达蛋白 RT-PCR 分析

按照上述方法收集菌体, 采用天根生化科技(北京)有限公司的细菌总 RNA 提取试剂盒(DP430)提取总 RNA。取 2 ug 总 RNA 进行反转录, 反转录方法参照 TaKaRa 双链反转录试剂盒说明书。RT-PCR 检测参考文献(黄雨薇等, 2015): 荧光定量所用的内参基因为 16S rRNA, 利用 Primer 5.0 设计引物(表 2); 反应体系为 20 μL: PowerUp™ SYBR Green Master Mix (2×) 10 μL, 上下游引物各 1.2 μL, cDNA 40 ng, 最后添加灭菌水至 20 μL, 设 3 个重复样品; 实时定量检测采用 StepOne™ and StepOnePlus™ 荧光定量 PCR 仪(ABI, USA)进行, 反应条件为: 95℃预变性 2 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环; 融解曲线测定为从 60℃到 95℃, 定量数据采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算得出, 相对定量的结果为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。当定量结果 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 时, 即表示为蛋白 mRNA 的上调倍数; 当定量结果 $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ 时, 即表示为蛋白 mRNA 的下调倍数; 当定量结果 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ 时, 即表示为蛋白 mRNA 表达量无变化。

表 2 实时荧光定量 PCR 的引物序列
Table 2 Sequences of qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Forward primers(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primers(5'→3')
16S rRNA	CCTTCGCCATCGGT GTTCCCT	CGGTTTGTCGCGTCT GCTGT
MurG	AGGTCGCTGCCGTG GGACTG	GGGGTGAAGTGGGC GTCCGT

3.7 分析方法

抗生素的最低抑菌浓度采用试管二倍稀释法测定, 具体方法见参考文献(Sanders and Sanders, 1974; 曲径等, 2015); 细菌细胞壁含量采用湿量法测定, 具体方法见参考文献(彭伟梦, 2010); 蛋白质含量采用 Bradford 法测定, 具体方法见参考文献(Bradford, 1976)。

作者贡献

陈鹏是本研究实验工作的具体执行人, 完成数据分析和论文初稿的写作; 黄运红和李非负责文献查阅、实验辅助; 李素珍负责部分实验操作; 龙中

儿是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31160029; 31360018)和江西省自然科学基金项目(20132BAB-204007)共同资助。

参考文献

- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buchanan R.E., and Gibbons N.E., eds., *Microbiology Research Institute of China Science Academ., trans.*, 1984, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Science Publishing House, Beijing, China, pp.1186-1198 (布坎南 R.E., 吉本斯 N.E., 主编, 中国科学院微生物研究所, 主译, 1984, 伯杰细菌鉴定手册, 科学出版社, 中国, 北京, pp. 1186-1198)
- Dai F., Huang Y.H., Ning X, and Long Z.E., 2011, Antibacterial activities of antibiotics produced by micromonospora carbonacea to xanthomonas oryzae pvoryzae, *Nongyao (Agrochemicals)*, 50(4): 302-304 (戴菲, 黄运红, 宁茜, 龙中儿, 2011, 炭样小单孢菌抗生素对水稻白叶枯病菌的抑菌作用, *农药*, 50(4): 302-304)
- Gupta S., Banerjee S.K., Chatterjee A., Sharma A.K., Kundu M., and Basu J., 2015, Essential protein SepF of mycobacteria interacts with FtsZ and MurG to regulate cell growth and division, *Microbiology*, 161: 1627-1638
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000108>
- Huang Y.W., Ye Y.T., Cai C.F., Wu P., Chen K.Q., Wu T., Xu D.H., Peng K., Lin X.X., and Luo Q.G., 2015, The effect of cholesterol and bile acid metabolism synthesis pathway related enzymes in the liver and intestine under oxidized fish oil in *ctenopharyngodon idellus* pond, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(8): 1636-1646 (黄雨薇, 叶元土, 蔡春芳, 吴萍, 陈科全, 吴韬, 徐登辉, 彭侃, 林秀秀, 罗其刚, 2015, 氧化鱼油对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝胰脏、肠道胆固醇、胆汁酸合成代谢的影响, *基因组学与应用生物学*, 34(8): 1636-1646)
- Isono K., 1991, Current progress on nucleoside antibiotics, *Pharmacology and Therapeutics*, 52(3): 269-286
[http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90028-K](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(91)90028-K)
- Jiang H., Cheng Y.R., and Zheng W., 2007, Daidzein and genistein produced by a marine micromonospora



- carbonacea FIM02-635, *Zhongguo Haiyang Yaowu* (Chinese Journal of Marine Drugs), 26(1): 8-12 (江红, 程元荣, 郑卫, 2007, 海洋碳样小单孢菌产生的大豆黄素和染料木素, *中国海洋药物*, 26(1): 8-12)
- Koch A.L., 2003, Bacterial wall as target for attack past, present, and future research, *Clin Microbiol Rev*, 16(4): 673-687
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.4.673-687.2003>
- Li J., Huang Y.H., Li L.M., Peng W.M., and Long Z.E., 2013, Screening of prolific micromonospora carbonacea in antibiotics production by heat mutagenesis, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology bulletin), 4: 147-151 (李瑾, 黄运红, 李鹿鸣, 彭伟梦, 龙中儿, 2013, 抗生素高产炭样小单孢菌的热诱变育种, *生物技术通报*, 4: 147-151)
- Long Z.E., Zhu Y.J., Huang Y.H., and Fu X.Q., 2008a, Isolation and identification of a strain of *Micromonospora* with broad-spectrum antimicrobial activity, *Weishengwuxue Tongbao* (Microbiology), 35(3): 378-383 (龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 付学琴, 2008a, 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定, *微生物学通报*, 35(3): 378-384)
- Long Z.E., Zhu Y.J., Huang Y.H., and Fu X.Q., 2008b, Isolation and purification of antibiotic from the fermentation broth of micromonospora carbonacea JXNU-1 and its physical-chemical properties, *Weishengwuxue Tongbao* (Microbiology), 35(9): 1450-1454 (龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 付学琴, 2008b, 炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质, *微生物学通报*, 35(9): 1450-1454)
- Ma L.H., Tian J., Pei X.Y., Wang Y.R., and Li P.J., 2015, Dynamic study and screening of new markers of spermatogonial stem cells by iTRAQ protein mass spectrometry, *Zhonghua Nan Kexue Zazhi* (National Journal of Andrology), 21(3): 200-207 (马良宏, 田稼, 裴秀英, 王燕蓉, 李培军, 2015, 应用 iTRAQ 质谱分析技术对小鼠精原干细胞标志物进行动态研究与筛选, *中华男科学杂志*, 21(3): 200-207)
- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin - Lecreulx, D., and Den Blaauwen T., 2007, The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 65(4): 1106-1121
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05851.x>
- Peng W.M., 2010, Studies on the Antibacterial Activity of a new nucleoside antibiotic from a strain of *Micromonospora carbonacea*, Thesis for M.S., Jiangxi Normal University, Supervisor: Long Z.E., pp.18-20 (彭伟梦, 2010, 一株炭样小单孢菌产新型核苷类抗生素的抗菌作用研究, 硕士学位论文, 江西师范大学, 导师: 龙中儿, pp. 18-20)
- Qu J., Yin Z.Q., Jia R.Y., Peng L.C., Kang S., and Li L., 2015, Antibacterial activity of crude extract from twenty traditional Chinese medicines like *Artemisia argy* against *Pasteurella multocida* in vitro, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Huazhong Agricultural University), 34(2): 91-94 (曲径, 殷中琼, 贾仁勇, 彭练慈, 康帅, 李莉, 2015, 艾叶等 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性, *华中农业大学学报*, 34(2): 91-94)
- Rachakonda S., and Cartee L., 2004, Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics, *Current Medicinal Chemistry*, 11(6): 775-793
<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043455774>
- Sanders W.E., and Sanders C.C., 1974, Microbiological characterization of evernimocins B and D, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6(3): 232-238
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.6.3.232>
- Silver L.L., 2006, Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics?, *Biochem Pharmacol*, 71: 996-1005
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.029>
- Sino K., 1988, Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis, *The Journal of Antibiotics*, 41(12): 1711-1739
<http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.41.1711>
- Tang J.S., and Gillevet P.M., 2003, Reclassification of atcc 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53: 995-997
<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02372-0>
- Winn M, Goss R.J.M., Kimura K.I., and Bugg T.D.H., 2010, Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis, *Natural Product Reports*, 27(2): 279-304
<http://dx.doi.org/10.1039/B816215H>