

一株产紫杉醇中国红豆杉内生真菌的分离和鉴定

耿直 刘开辉 赵贇鑫 李娟花 邓百万* 彭浩

(陕西理工学院生物科学与工程学院 陕西 汉中 723000)

摘要: 从秦巴山区中国红豆杉茎和根中分离得到一批内生真菌, 其中一株内生真菌 LB-10 的发酵液经紫外分光光度法、HPLC 和 HPLC-MS 分析, 表明其代谢产物中存在紫杉醇, 含量为 846.1 $\mu\text{g/L}$ 。通过形态学研究、ITS 序列分析, 确定该菌株为绿僵菌。

关键词: 内生真菌, 紫杉醇, 绿僵菌

Isolation, Identification of an Endophytic Taxol-producing Fungus Obtained from *Taxus Chinensis*

GENG Zhi LIU Kai-Hui ZHAO Yun-Xin LI Juan-Hua DENG Bai-Wan* PENG Hao

(School of Biology Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: This study investigated the endophytic fungi associated with *Taxus chinensis* growing in the Qinba Mountains. The strain LB-10 was found to produce taxol *in vitro* with a yield of 846.1 $\mu\text{g/L}$, detected by UV, HPLC, and HPLC-MS. The strain LB-10 was grouped into *Metarhizium anisopliae* based on the morphological traits and ITS sequencing.

Keywords: Endophytic fungi, Taxol, *Metarhizium anisopliae*

紫杉醇(Taxol, 商品名 Paclitaxel), 是从红豆杉属(*Taxus*)植物中提取出来的天然抗癌药物, 具有广谱的抗肿瘤活性, 尤其对卵巢癌和转移性乳腺癌有显著的疗效。现今临床药用紫杉醇主要来源于从濒危植物红豆杉组织中提取, 但已严重破坏自然资源, 不利于红豆杉保护。为了满足市场对紫杉醇需求, 研究人员试图利用细胞组织培养方法及化学合成的方法来生产紫杉醇, 但由于上述方法难以规模化以及成本较高, 目前还没有广泛的应用价值。

1993 年, 美国化学家 Stierle 和植物病理学家 Strobel^[1-2]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的韧皮部

分离出一株产紫杉醇的内生真菌, 其紫杉醇产率虽较低, 但是开辟了一条产生紫杉醇等活性物质的新途径。在我国, 周东坡^[3]和马玉超^[4]相继从不同属地红豆杉分离得到一批产紫杉醇内生真菌, 主要有紫杉霉属(*Taxomyces*)、盘单毛孢属(*Monochaetia*)、镰刀霉属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)等数十个属内生真菌, 但由于产量较低, 仍不能满足工业化生产需求。筛选高产内生真菌菌株, 进行菌种改良及工程菌株的构建是解决目前内生真菌发酵生产紫杉醇的主要途径。本文从秦巴山区中国红豆杉植物组织中分离得到一株紫杉醇高产内生真菌, 现将结果

基金项目: 陕西省重点实验室项目(No. 08JZ21); 陕西省教育厅项目(No. 08JK248, 08JK244); 陕西理工学院项目(No. SLJQD0712, SLJQD0713)资助

* 通讯作者: ✉ Dengbw2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-29; 接受日期: 2009-09-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 材料: 中国红豆杉(*Taxus chinensis*), 采于陕西佛坪。

1.1.2 培养基: CPDA 培养基^[5]: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 琼脂 15–20 g, 水 1000 mL, PH 自然, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min, 去琼脂为液体培养基; 查氏培养基^[6]: NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15–20 g, 水 1000 mL, pH 自然, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要仪器: 高效液相色谱仪(LC2000), 质谱仪(Agilent 1100 LC/MSD), 紫外-可见分光光度计(UV-2550, SHIMADZU, Japan), 人工气候箱(LRH-250-G-S), 双层恒温培养振荡器(ZHWY-2102C), 旋转蒸发仪(IKA RV 10), PCR 仪(Model 680, BIO-RAD), 高级研究显微镜(E600, Nikon)等。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌分离与纯化: 将中国红豆杉茎、根切成 4 cm–5 cm 长的小段, 用刀轻轻刮去表面, 在超净工作台用无菌水反复冲洗 2–3 次, 用 75% 的酒精冲洗 30 s, 后用 0.1% 升汞消毒 5 min, 再用无菌水清洗 3–4 次, 用解剖刀割下表层皮, 剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的正方形小块, 31°C 培养 3–10 d, 待菌丝长出后, 挑取菌丝尖端于 CPDA 培养基中, 培养 3–5 d 后, 再挑取菌丝分离单个菌落, 直至为纯培养。

1.2.2 内生真菌形态观察: 纯培养物接种于查氏培养基, 28°C 下倒置培养, 待刚长出菌丝时, 将无菌的盖玻片斜插入平板内(插片法)^[7], 继续培养至菌丝爬满盖玻片, 将玻片取出, 在显微镜下观察其特征。

1.2.3 ITS 测定: 采用 CTAB 方法^[8]进行细胞总 DNA 的提取, PCR 扩增引物为: ITS1: 5'-TCCGT AGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3'。20.0 μL PCR 反应体系: 1 × PCR buffer、2.5 mmol/L MgCl₂、0.25 mmol/L dNTPs、引物 ITS1 和引物 ITS4 各 0.25 mmol/L、0.05 U/μL *Taq* 酶、约 2.5 ng/μL 基因组 DNA。PCR 扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 80 s, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物的纯化: DNA 片段经 1.5% 凝胶检测, 用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收琼脂糖凝

胶上的 PCR 产物(具体方法按 TM Gel Extraction Kit 说明书进行)。纯化后的 PCR 产物由上海生物技术服务有限公司进行双向测序。

1.2.4 代谢产物检测: 将菌株 LB-10 接种于 CPDA 液体培养基中, 28°C、180 r/min 摇床上培养 7 d, 抽滤发酵液, 发酵液用乙酸乙酯萃取, 菌丝用乙酸乙酯在超声条件下萃取, 收集合并乙酸乙酯相, 40°C 浓缩蒸干, 甲醇定容。

紫外分光光度法检测: 标品购自 Sigma 公司, 甲醇定容, 在波长范围为 190 nm–300 nm 处对标准品和样品进行光谱扫描。

HPLC 和 HPLC-MS 检测: 标品购自 Sigma 公司, 甲醇定容, 配置成 0.01–0.08 mg/mL 的梯度, 绘制标准曲线。色谱条件: 水-甲醇-乙腈(33:35:32, V/V/V) 为流动相, 流速 1 μL/min, 检测波长 228 nm, 进样量 20 μL, 柱温: 室温, 色谱柱: C18 (4.6 mm × 150 mm)。精密称取紫杉醇标准品约 2 mg, 甲醇定容至 10 mL, 得母液浓度为 0.2 mg/mL, 将母液依次稀释成浓度梯度为 0.08、0.04、0.02 和 0.01 mg/mL, 取 20 μL 进样 ($N = 4$), 得回归方程为 $y = 6.0878 + 3589.3913x$, $r = 0.999222$ 建立标准曲线。HPLC-MS 检测由华中科技大学国家光电实验室协助完成。

2 结果及分析

2.1 内生真菌 LB-10 的形态特征

在查氏培养基上 28°C 培养 5 d, 菌株 LB-10 生长较快, 菌落直径达 3 cm–4 cm, 质地致密, 菌落平展, 初期为白色短绒状菌丝, 向四周坪铺生长, 菌落边缘规则, 后期菌落中央颜色变深, 由中央向四周菌落的颜色变化是: 墨绿-深绿-橄榄绿-白色, 菌落背面颜色逐渐变黑, 其中绿色部分即为分生孢子团块, 白色部分即分生孢子团块边缘围绕的无色菌丝, 无渗出物(图 1 A)。

菌株 LB-10 气生菌丝有隔, 较粗, 直径 2.5 μm–3.75 μm。分生孢子梗由气生型菌丝生出, 有隔, 无色, 光滑, 近顶部多分支, 为柱状瓶梗(图 1 C)。产孢细胞无色, 其形态类似拟青霉的帚状枝(图 1 B)。分生孢子单胞, 为卵圆形或柱状, 链状排列, 一端较尖, 一端略钝, 孢子表面光滑, 不染色时单个孢子无色或淡绿色, 大量聚集时呈绿色, 孢子长 7.5 μm–12.5 μm, 宽 2.5 μm–5.0 μm, 多数长为 7.5 μm, 宽为 2.5 μm(图 1 D)。基于形态特征分析, 初步将内生真菌 LB-10 鉴定为绿僵菌属真菌。

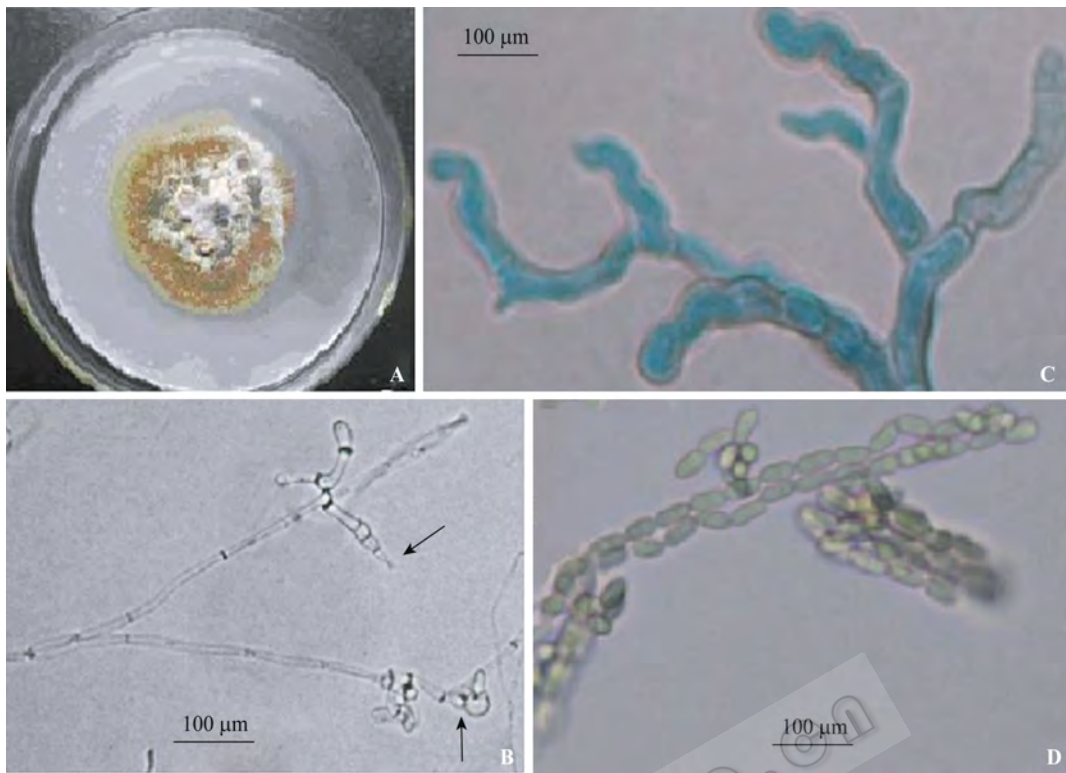


图 1 内生真菌 LB-10 菌株的形态特征

Fig. 1 Morphological traits of the endophytic fungus, LB-10

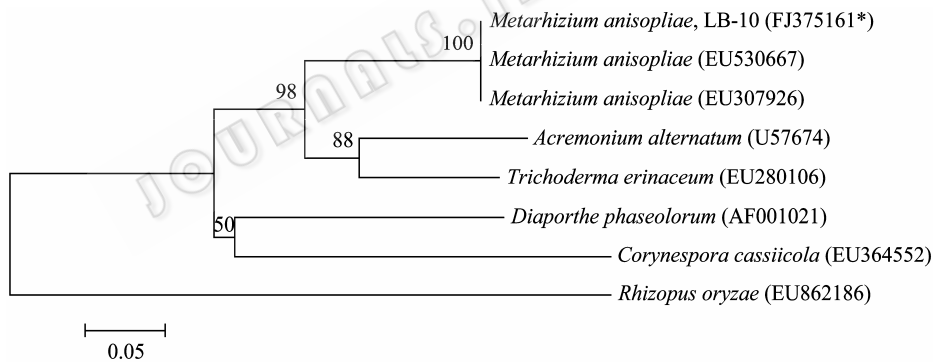


图 2 内生真菌 LB-10 的 ITS 进化树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of ITS sequences of the endophytic fungus, LB-10

注: 括号内为序列登录号, 0.05 表示 100 个碱基中 5 个发生变异. 右上方有星号的为我们测定的序列.

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses, 0.05 means five changed per 100 bases. Species marked by asterick are sequenced by ourselves.

2.2 ITS 序列分析

利用 ITS 通用引物(ITS1, ITS4)对内生真菌 LB-10 的 ITS 序列进行 PCR 扩增, 获得一约 500 bp 的单一 DNA 条带, 对纯化的 DNA 产物进行测序分析, 内生真菌 LB-10 的 ITS 序列长为 518 bp。序列提交 GenBank 数据库并进行 BLAST 检索, 下载同源性较高的数据, 与 LB-10 的 ITS 序列组成一套数据集, 用 ClustalX^[9]软件进行多序列比对并进行人工校正, 运用统计分析和系统发育分析软件

MEGA3.1^[10]按照 N-J 法^[11]聚类构建系统发育树, 经自举法检验(1000 次重复), 得到进化树(图 2)。内生真菌 LB-10 和绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)的 ITS 序列同源性高达 99%以上, 该结果支持形态鉴定的结果, 即内生真菌 LB-10 为绿僵菌。

2.3 内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 产生紫杉醇分析

2.3.1 紫外-可见分光光度计分析:

根据紫外-可见分光光度法光谱扫描结果图看出: 紫杉醇标准品和

LB-10 发酵产物的光谱图基本相似(图 3), 可以初步判断发酵液中可能含有紫杉醇或结构类似物。但是光谱图不能完全重合, 原因是发酵液中成分较为复杂, 除紫杉醇外还可能含有紫杉烷或其他结构类似物, 此结果还需要用其他方法(如 HPLC-MS 等)对代谢产物进行检测分析。

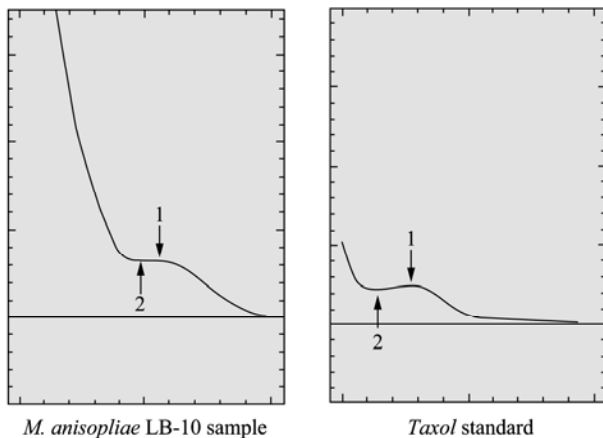


图 3 内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 产生紫杉醇紫外光谱图

Fig. 3 Detection of the fungal taxol of *Metarhizium anisopliae*, LB-10 by UV-Vis

2.3.2 HPLC 分析: 在相同 HPLC 的条件下, 紫杉醇标准品在 7.659 min 左右处有较强的吸收峰(图 4), 而 *Metarhizium anisopliae* LB-10 的发酵产物乙酸乙酯抽提物的保留时间为 7.455 min, 结果表明, *M. anisopliae* LB-10 可能产生紫杉醇或结构类似物。依照紫杉醇的标准曲线($y = 6.0878 + 3589.3913x$, $r = 0.999222$)可知 *M. anisopliae* LB-10 可能产生紫杉醇或结构类似物的量为 846.1 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.3 HPLC-MS 分析: 在液质联用分析中, 紫杉醇标准品产生一个 m/z 为 854.2 的 $M + H^+$ 离子峰和 m/z 为 876.3 的 $M + Na^+$ 离子峰(图 5), *Metarhizium anisopliae* LB-10 产生 854.2 的离子峰和 $M + Na^+$ 为 m/z 876.1 的离子峰。此结果表明: 标准样和样品的质谱图基本一致, 其中 854.2 和 876.1 处的两离子峰是紫杉醇分子的 $M + H^+$ 和 $M + Na^+$, 因而可以说明 LB-10 发酵液中含有紫杉醇。

3 讨论

自 Stierle 等^[1]从短叶红豆杉的韧皮部中分离得到安德鲁紫杉菌后, 大量的产紫杉醇内生真菌被分离得到, 主要有紫杉霉属(*Taxomyces*)、盘单毛孢属

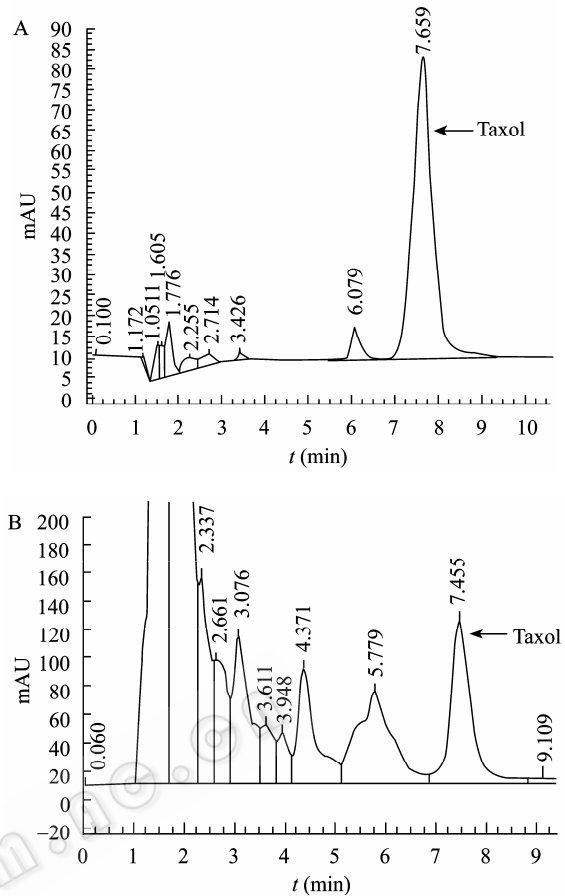


图 4 内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 产生紫杉醇分析

Fig. 4 Detection of the fungal taxol of *Metarhizium anisopliae* LB-10 by HPLC analysis

(*Monochaetia*)、镰刀霉属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)等数十个属内生真菌, 出现频率较高的是拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、茎点霉属(*Phoma*)、镰孢属(*Fusarium*)等内生真菌, 显示产紫杉醇内生真菌具有丰富的多样性, 而红豆杉的产地和生态环境是影响产紫杉醇内生真菌种类和数量的主要因素, 因此从特殊生境中或许能筛选出特异的产紫杉醇内生真菌。

本研究从秦巴山区中国红豆杉茎中分离得到一株产紫杉醇内生真菌, 经过形态学特性研究和 ITS 序列分析, 鉴定该菌株为绿僵菌。绿僵菌属真菌主要用于农林害虫的生物防治中, 目前, 有关绿僵菌属真菌产紫杉醇方面的报道较少^[12]。本实验通过紫外-可见分光光度法、HPLC、HPLC-MS 分别对菌株 LB-10 发酵产物进行分析检测, 确定其产紫杉醇, 产量为 846.1 $\mu\text{g/L}$, 和已报道的紫杉醇生产真菌相比, 该菌株产量较高^[13-14]。该菌株在改良的 CPDA

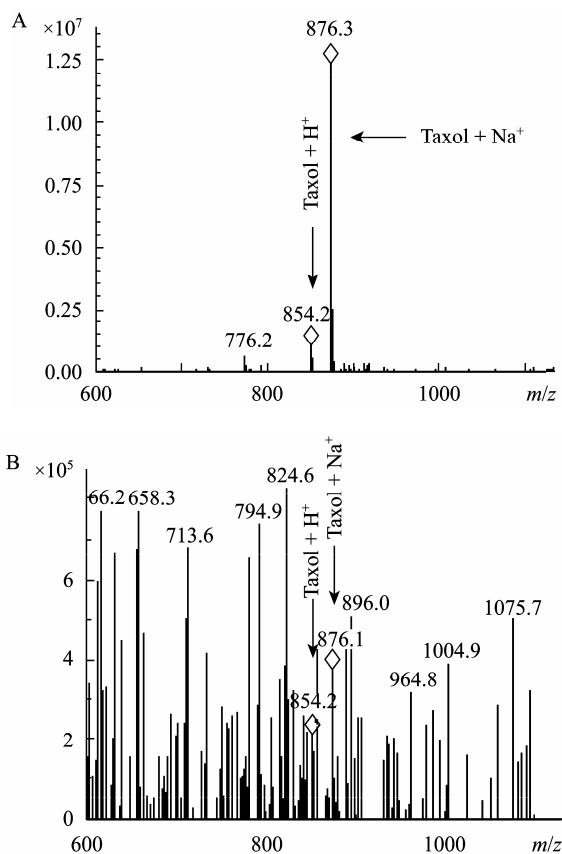


图5 内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 紫杉醇的液质联用分析

Fig. 5 Determination of the fungal taxol of *Metarhizium anisopliae* LB-10 by HPLC-MS analysis

液体培养基中生长较快, 产率稳定, 有利于通过驯化、诱变育种及优化发酵条件来提高紫杉醇的含量, 以达到工业化生产的要求。

参 考 文 献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces* and *reanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 1993, **260**(9): 214-216.
- [2] Stierle A, Stierle D, Strobel G. Taxol production by a microbe: US, 6013493. 2000-01-11.
- [3] 周东坡, 平文祥, 孙建秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究. *微生物学杂志*, 2001, **21**(1): 18-23.
- [4] 马玉超, 赵凯, 王世伟, 等. 产紫杉醇内生真菌的生物多样性. *菌物研究*, 2003, **1**(1): 28-32.
- [5] 范季容, 李斌, 沈萍. *微生物实验*. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [6] 沈萍, 范季容, 李广武. *微生物学实验*. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [7] 刘士旺, 真菌形态的几种观察方法. *生物学通报*, 1998, **33**(10): 45.
- [8] White TJ, Bruns T, Lee S. Amp lification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // Innis MA, Gelf DH, Sninsky JJ, *et al.* eds. *PCR Protocolsm*. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewnia KF, *et al.* The ClustaIX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997(25): 4876-4882.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004(5): 150-163.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987(4): 406-425.
- [12] 郭素萍. 绿僵菌研究的新进展. *科技情报开发与经济*, 2004, **10**(14): 185-186.
- [13] 郭晓静, 王俊鹏, 宋晓平, 等. 南方红豆杉产紫杉醇内生真菌的分离鉴定. *西北植物学报*, 2007, **27**(9): 1874-1878.
- [14] 田仁鹏, 杨桥, 周国玲, 等. 一株产紫杉醇的南方红豆杉内生真菌的分离及分类研究. *武汉植物学研究*, 2006, **24**(6): 541-545.