

# 中国红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离与鉴定

殷东林, 孙 伟, 王锐丽

(信阳农林学院, 河南 信阳 464000)

**摘要:**为了开发生产紫杉醇的新途径,以中国红豆杉根、茎、叶为试验材料,对其中产紫杉醇的内生真菌进行分离和鉴定。结果表明:从中国红豆杉中共分离出 10 株内生真菌,在 PDA 液体培养基中发酵后经薄层层析法检测,出 2 株能够产生紫杉醇,对产紫杉醇的菌株进行形态学鉴定表明,其中一株为青霉属,另一株为芽枝霉属。

**关键词:**中国红豆杉;紫杉醇;内生真菌;薄层层析;鉴定

**中图分类号:**Q949.32;S791.49

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)09-0100-04

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 最早是由 Wani 等<sup>[1]</sup>从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离得到的,其具有天然抗癌活性。

目前紫杉醇的主要来源仍是从天然红豆杉属植物组织中提取。由于紫杉醇在该属植物的树皮中含量极低,而且红豆杉又是国家保护级的濒危物种,靠从红豆杉组织提取紫杉醇不能满足市场需求,为了解决紫杉醇药源紧缺现状,国内外学者在紫杉醇的化学合成和红豆杉的组织细胞培养等方面进行了许多研究,并取得了一定的成果,但是生产的紫杉醇成本昂贵,目前还没有工业化生产的价值。

Stierle 与 Stroble<sup>[2]</sup>首次报道了从太平洋紫杉树中分离出可产紫杉醇的内生真菌 (*Taxomyces andreanae*),提供了一个可能生产紫杉醇的新途径。利用微生物发酵生产紫杉醇具有内生真菌生长迅速、易于培养、可以在发酵罐中进行工业化生产,且所用的培养基成本较低等诸多优点。因此,筛选产紫杉醇内生真菌,用微生物发酵的方法生产紫杉醇,是解决药源问题的有效途径。研究从信阳地区的中国红豆杉植物组织中分离得到 2 株产紫杉醇的内生真菌,并对其进行鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 树种 信阳本地生长的六年生以上的中

国红豆杉,取其根、茎和叶作为试验材料。

1.1.2 器材 手术剪、手术刀、接种针、酒精灯、XFS-30CA 电热式压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司)、SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司)、FA2004 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)、DNP-9052 型恒温培养箱(宁波东南仪器有限公司)、RE52-86A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、KDC-140HR 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、层析缸、SHB-B95A 型循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、布氏漏斗和 UB100i 型显微镜(重庆奥浦光电技术有限公司)。

1.1.3 试剂 PDA 培养基、无菌水、0.1% 升汞溶液、葡萄糖、75% 酒精、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、GF254 型硅胶、三氯甲烷、乙腈、浓硫酸、香草醛和紫杉醇标准品 JS90177-20 mg(纯度为 98%)。

### 1.2 方法

1.2.1 中国红豆杉内生真菌的分离与纯化 (1) 外植体的处理。将采集来的中国红豆杉的根、茎、叶先放到洗衣粉溶液中浸泡 30 min,并用细毛刷刷去表面污垢,然后在自来水中冲洗 20 min。冲洗完成后转移至超净工作台上,用无菌滤纸吸干,然后用 75% 乙醇消毒 30 s,用无菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% 升汞溶液消毒 8 min,再用无菌水冲洗 3~5 次,用手术刀将消毒后的根、茎、叶切成 0.5 cm 的小段,并从中间剖开备用。(2) 接种。将处理好的中国红豆杉的根、茎、叶接种于 PDA 固体培养基平板中,于 28℃ 的恒温培养 3~5 d,

收稿日期:2014-04-24

第一作者简介:殷东林(1983-),男,河南省潢川县人,硕士,讲师,从事生物技术研究。E-mail:ydl669@126.com。

每天观察 1 次,确定菌丝生长时间。(3)分离纯化。当平板中的中国红豆杉外植体长出菌落后,挑取单菌落接入 PDA 斜面培养基中,28℃ 恒温培养。当菌落长满斜面后,划线接种于平板培养基中,每 2 d 观察 1 次,根据菌落的形状颜色以及长出时间的不同,有不纯的菌落就继续划线分离培养,直到得到纯种。将纯化后的菌株编号记录,接入 PDA 斜面培养基,于 28℃ 恒温培养 6~7 d 后,保存于 4℃ 冰箱。

1.2.2 筛选产紫杉醇菌株 (1)摇床培养。将分离纯化的菌株分别接种到液体 PDA 培养基中,进行摇床振荡培养。摇床温度为 27℃,转速为  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,避光培养,液体培养时间一般为 12 d。(2)液体培养物的提取。将三角瓶中的发酵液进行抽滤,抽滤后取上清液在 50℃ 下进行旋转蒸发,浓缩至原体积的 1/10,加入相同体积的乙酸乙酯-丙酮(体积比为 1:1)进行萃取,萃取 2~3 次,收集有机相。将发酵液在 50℃ 下旋转蒸发至液体蒸发完,残留物用 10 mL 甲醇溶解,在 4℃ 冰箱中保存备用。(3)提取物的检测。采用薄层层析的方法(TLC)进行检测,检测菌种液体培养的产物里是否含有紫杉醇。①把 GF254 硅胶板在电热鼓风干燥箱中 110℃ 活化 30 min。②用三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇按照体积比为 88:7:5 的比例

配制展开剂<sup>[3]</sup>。③按照甲醇:浓硫酸:香草醛体积比为 90 mL:10 mL:1 g 的比例制成特异性显色剂<sup>[4]</sup>,置于喷壶中。④取 0.03 g 紫杉醇标准品,溶于 60 mL 甲醇中,配制成浓度为  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  紫杉醇标准品溶液。⑤检测方法:在薄层板的一端 1 cm 处用铅笔画一直线,在直线上均匀的点几个点作为标记。用毛细管吸取适量的紫杉醇标准品溶液和样品溶液,分别点在薄层板标记处,点样完成后,将薄层板置于装有展开剂的层析缸中,展开时间为 30 min,当展开剂到达薄层板前沿时取出。在烘箱中干燥薄层板后,用喷壶均匀喷洒特异性显色剂,喷洒完用电吹风加热,直至薄层板上出现斑点。紫杉醇在特异性显色剂喷洒后会显示蓝色斑点,并测量斑点的 Rf 值<sup>[4]</sup>。

1.2.3 产紫杉醇菌株的形态学鉴定 挑取适量菌丝,制水浸片,对菌种的菌丝、孢子进行显微镜观察并记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 内共生真菌分离结果

除去污染的杂菌和霉菌之外,从中国红豆杉的茎中分离得到了 10 株中国红豆杉内生真菌(见图 1)。

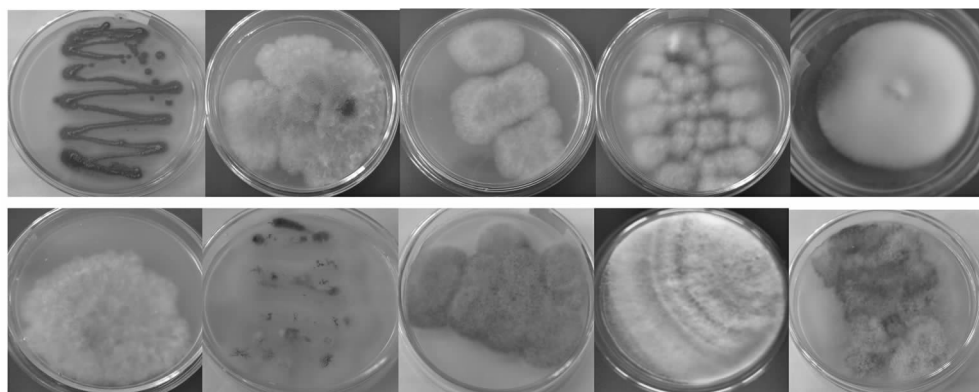


图 1 从中国红豆杉中分离纯化得到的内生菌

Fig. 1 Endophytic fungi from *Taxus chinensis*

### 2.2 筛选产紫杉醇菌株的结果

在中国红豆杉内生真菌的鉴定试验中,通过薄层层析法对分离菌种的液体培养产物进行检

测,从中国红豆杉得到了 2 株能够产生紫杉醇的内生真菌,编号为 1 号和 2 号(见图 2)。

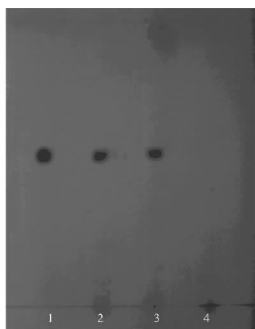


图2 分离内生真菌培养产物的薄层层析检测结果

1为紫杉醇标准品;2为1号菌株;3为2号菌株;  
4为阴性对照

Fig. 2 Detection of isolated endophytic fungi by TLC

1: Paclitaxel standard; 2: Strain No. 1; 3: Strain  
No. 2; 4: Negative control

## 2.3 产紫杉醇菌株形态学鉴定结果

2.3.1 产紫杉醇内生真菌的形态学特征 观察结果可知,1号菌株菌落灰绿色,边缘菌丝较短,为白色,菌落表面粉状,细腻,较老菌丝表面有凸起,有少量短绒毛。多核菌丝有隔膜,孢子呈卵圆形,菌丝顶端产生若干2节小分枝,聚拢在一起形成分生孢子器,呈扫帚状,小分枝顶端散发出孢子(见图3)。2号菌株菌落中央为墨绿色,菌落外被一层白色菌丝,菌丝呈短绒状,边不规则,中央隆起。菌丝有隔,分枝发达;分生孢子梗高,直立,在顶部附近各种分枝成簇或单生,卵圆形到圆柱形和不规则形,常成简单或分支的链(见图4)。

2.3.2 形态学鉴定结果 参照魏景超的《真菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>对两种菌株进行鉴定(见表1),可知,一株为青霉菌,另一株为芽枝霉属。

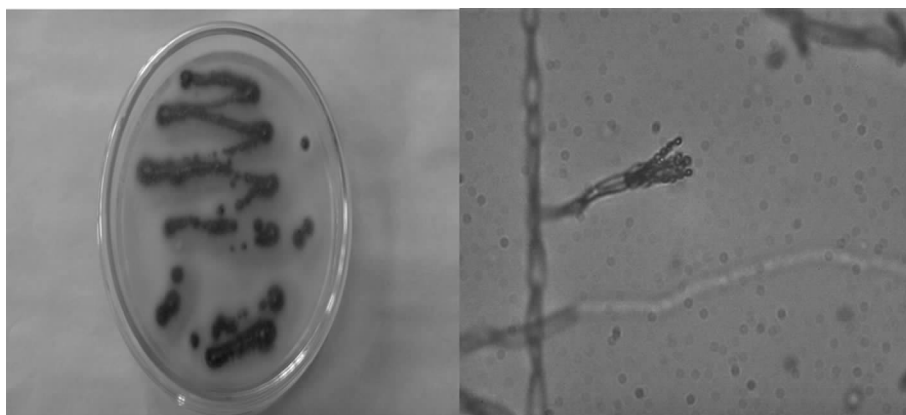


图3 产紫杉醇内生真菌1号菌株菌落特征和孢子形态

Fig. 3 Characteristics and morphology of  
endophytic taxol-producing strain 1

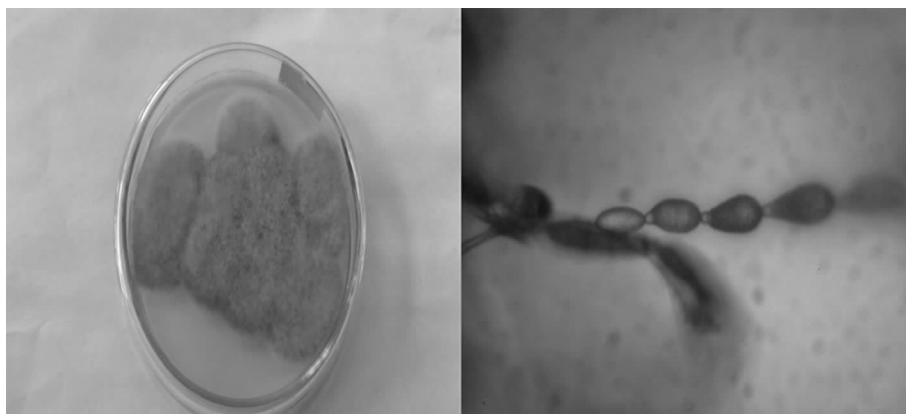


图4 产紫杉醇内生真菌2号菌株菌落特征和孢子形态

Fig. 4 Characteristics and morphology of  
endophytic taxol-producing strain 2

表 1 产紫杉醇内生真菌菌株鉴定结果  
Table 1 Identification results of endophytic fungi

菌株 Strains	鉴定结果 Identification	Rf
1	青霉属	0.47
2	芽枝霉属	0.48

### 3 结论与讨论

目前国内外学者已经从红豆杉中分离出了多种产紫杉醇的内生真菌。Stierle 博士等<sup>[2]</sup>从短叶红豆杉的韧皮部中分离得到第一个产紫杉醇的内生真菌,命名为安德鲁紫杉菌。邱德有等<sup>[6]</sup>从云南红豆杉树皮中分离出一种内生真菌,被鉴定为 YFI。Strobel 等<sup>[7]</sup>从西藏红豆杉中分离到一株产生紫杉醇的内生真菌,被鉴定为小孢拟盘多毛孢,尼泊尔盘端鹿角菌。王建峰等<sup>[8]</sup>从南方红豆杉中分离到一种可以产生紫杉醇的内生真菌,被鉴定为瘤座菌属。周东坡等<sup>[9]</sup>从东北红豆杉中发现一种内生真菌,被鉴定为树状多节孢。耿直等<sup>[10]</sup>从中国红豆杉中分离到一株产紫杉醇的内生真菌,被鉴定为绿僵菌。这些真菌的紫杉醇产量范围为 25~846  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,具有形态和地域的多样性,紫杉醇产率有很大差异,但是距工业化生产都还有一定差距。

该试验从中国红豆杉中分离得到 10 个内生真菌,通过 TLC 对其发酵物进行了检测,发现有 2 个菌株能够产生紫杉醇,对产紫杉醇菌株进行形态学鉴定,结果表明一株为青霉属,另一株为芽

枝霉属。芽枝霉属的菌株在改良的 CPDA 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] Wani M C, Taylor H L, Monro F, et al. Plant antitumor agent VI: The Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brebiifolia* [J]. J. Am. Chem. Soc., 1971, 93: 2325-2327.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by taxomyces and reanae, an endophytic fungus of *Pacific yew* [J]. Science, 1993, 260(9): 214-216.
- [3] 乔亮杰. 曼地亚红豆杉枝条中紫杉醇的提取纯化研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [4] 郭俊柯, 杨淑慎, 郭胜利. 曼地亚红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405-649.
- [6] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离[J]. 真菌学报, 1994, 13(4): 314-316.
- [7] Strobel G A, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142: 435-440.
- [8] Wang Jianfeng, Li Guiling, Lu Huaying, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193: 249-253.
- [9] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(1): 18-20.
- [10] 耿直, 刘开辉, 赵赞鑫, 等. 一株产紫杉醇中国红豆杉内生真菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 199-203.

## Isolation and Identification of Taxol-Producing Endophytic Fungi from *Taxus chinensis*

YIN Dong-lin, SUN Wei, WANG Rui-li

(Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang, Henan 464000)

**Abstract:** In order to develop new ways of taxol production, taking roots, stems and leaves of *Taxus chinensis* as materials, the taxol-producing endophytic fungi was isolated and identified. The results showed that ten strains of endophytic fungi had been isolated from *Taxus chinensis*, two strains could produce taxol by thin layer chromatography after fermentation in the PDA liquid culture medium, through morphological identification, it was determined that a strain was *Penicillium*, another strain was *Cladosporium*.

**Key words:** *Taxus chinensis*; taxol; endophyte fungi; thin layer chromatography; identification