

④ 47-49

从植物分离产紫杉醇的内生真菌的研究[†]

马天有 董兆麟

(西北大学生物学系,西安,710069)

TQ923
Q939.5

摘要 将生于秦岭地区的中国红豆杉树皮中分离得到的一株内生真菌,在马铃薯培养基中进行发酵试验,用薄层层析、薄层扫描检测。分析结果表明这株真菌能合成紫杉醇,高效液相色谱技术测定其紫杉醇含量约为 14.20 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 中国红豆杉;内生真菌;紫杉醇;薄层层析;高效液相色谱

分类号 Q939.5 **文献标识码** A **论文编号** 1000-274X(1999)01-0047-49

发酵

紫杉醇(taxol)是人类70年代初从短叶红豆杉(*Taxus brenifolia* nutt)^[1]树皮中分离提取到的一种二萜衍生物。后经 Horwitz 等研究证实紫杉醇具有独特的抗癌作用机理,它能使癌细胞内纺锤丝的形成受到抑制,有丝分裂不能正常进行,而阻止了癌细胞的扩散。故1992年被美国FAD批准用于卵巢癌的治疗。后又经多年的研究和临床实验,使紫杉醇的抗癌范围逐渐在扩大,目前进行的乳腺癌、肺癌的临床试验已取得很好的效果。

目前紫杉醇主要是从红豆杉树皮中提取的。由于红豆杉属于濒危珍稀植物,资源有限,生长又很慢,大量砍伐不但危及到自然界的生态平衡,而且也会带来紫杉醇原料的枯竭。因此,寻找紫杉醇未来新的生产途径,已成为摆在人类面前的一项重大研究课题。近年来国内外学者主要从3个领域进行探索,即化学合成法、植物细胞培养法^[2]和微生物工程法^[3]。目前人们普遍认为微生物工程法是一种最具潜在能力,最具可能性的一种方法^[4]。本文正是采用微生物工程技术,研究从我国秦岭地区生长的红豆杉树皮中,分离产紫杉醇的内生真菌的方法和结果。

1 材料和方法

1.1 材料来源

中国红豆杉(*Taxus chinensis*)来源于陕西省留坝县庙台子地区一几十年生老树。紫杉醇标准品购

自 Sigma 公司。

1.2 实验用培养基

固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 自然。配制方法是马铃薯去皮切碎,水煮 40 min,4 层纱布过滤,溶入葡萄糖及琼脂后加水定容。1.05 kg/cm²灭菌 20 min。

液体培养基:配制方法同上,只是不加入琼脂,分装至 250 mL 三角瓶中,每瓶 50 mL。1.05 kg/cm²灭菌 20 min 备用。

1.3 内生真菌的分离和纯化

取新采的红豆杉树皮,除去外层老化部分,切成 1 cm×1 cm 的小块,置于 75% 的酒精中消毒 5 min,用无菌水冲洗后置于马铃薯固体平板培养基上,25℃培养一段时间后周围长出少量菌丝。用接种针挑取不同部位的边缘菌丝,分别接种到固体平板上培养,长出新的菌落后,再挑取其尖端菌丝培养,如此反复纯化多次后即可得到一个纯菌株。

1.4 真菌培养物的预处理及样品溶液的制备

用马铃薯液体培养基,250 mL 三角瓶中装 50 mL 培养液,接少量菌丝,30℃,220 r/min,培养 6~7 d。培养物冷冻后用组织捣碎机匀浆 3 min(转速为 10 000 r/min),4 层纱布过滤,滤液中加入等体积的氯仿和甲醇混合液(CHCl₃-MeOH 10:1),充分振荡后静置 8~12 h,收集有机溶液相,并在 45℃条件下减压蒸发,残留物溶于 1 mL 甲醇中作为样品溶液备用。

[†] 收稿日期:1998-05-20

资金来源:陕西省自然科学基金资助项目(FH95401)

作者简介:马天有(1968-),男,硕士

1.5 薄层层析及薄层扫描对真菌培养物紫杉醇的检测

制备薄层板的硅胶 G 购自青岛海洋化工厂,选用的 3 种展开剂为二氯甲烷-甲醇(95:5 V/V);乙酸乙酯-异丙醇(94:6 V/V);氯仿-乙腈(9:1 V/V)^[3]。显色剂为 5% 的香草醛浓硫酸溶液。用喷雾显色法,100℃ 显色,获最清晰斑点为止。对出现与标准品有相同迁移率的薄层板进行扫描,扫描条件如下:反射式锯齿形扫描,狭缝为 1.2 mm×1.2 mm,线性参数 $S_x=3$,峰检出方式为面积法,灵敏度中,对标准品斑点扫描确定其测定波长为 520 nm。对同一斑点连续扫描 4 次,取其平均值,可初步估算样品溶液中紫杉醇的含量。

1.6 高效液相色谱对真菌培养物中紫杉醇含量的检测

HPLC 色谱仪:Backman Gold I HPLC system;检测仪:紫外检测仪。

HPLC 条件:C-18 反相柱,4.5 mm×200 mm,等浓度洗脱;流动相 MeOH:H₂O=65:35,流速 1 mL/min;检测波长 220 nm;进样量 20 μL。

2 结 果

2.1 产紫杉醇内生真菌的分离

从选用的中国红豆杉树皮中分离出 20 多株真菌菌株。薄层层析法分析结果显示,仅有编号为 QT₁₂ 的一株内生真菌出现了与标准品迁移率相同的斑点(图 1)。以 QT₁₂ 为实验菌株进行形态观察和检测。

2.2 内生真菌 QT₁₂ 的生长及形态特征

QT₁₂ 菌株的菌丝体为白色,菌丝较细,有横隔,菌丝多分枝,孢子呈短杆状,表面光滑(图 2)。QT₁₂ 在马铃薯固体培养基上生长较快,一般 4~5 d 可长满直径 9 cm 的培养皿,菌落表面呈白色,质地呈棉絮状,中间部分形成突起并在周围形成同心环。

2.3 高效液相色谱测定

采用高效液相色谱系统对 QT₁₂ 样品溶液进行检测,结果如图 3、4 所示。

由图 3、4 可见,样品中峰 I 与标准品中峰 I 的保留时间一致,即 $t_R=15.43$ min 可判断样品中峰 I 为紫杉醇的吸收峰。根据峰 I 的积分面积计算出样品中紫杉醇的含量,再根据发酵液总量可计算出 QT₁₂ 菌株液体培养物中紫杉醇含量约为 14.2 μg/L。

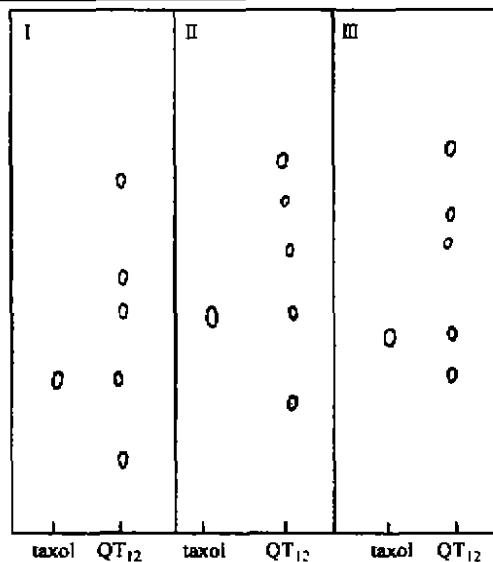


图 1 QT₁₂ 内生真菌

Fig. 1 The Endophytic Fungus QT₁₂

I 展开剂为二氯甲烷-甲醇(95:5 V/V)

II 展开剂为乙酸乙酯-异丙醇(96:4 V/V)

III 展开剂为氯仿-乙腈(9:1 V/V)

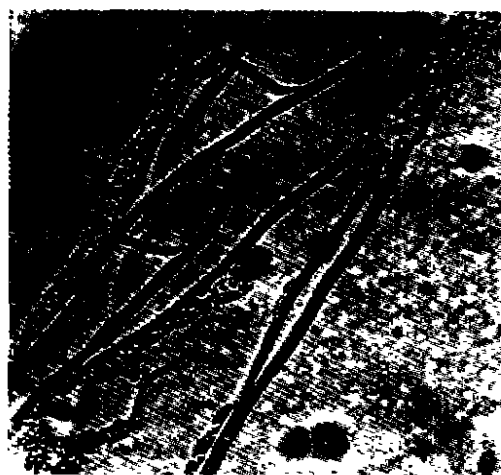


图 2 内生真菌 QT₁₂ 的菌丝

Fig. 2 The Hyphal Cell of the Endophytic Fungus QT₁₂

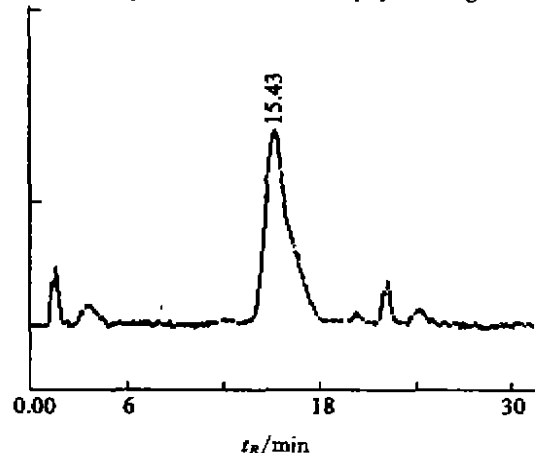
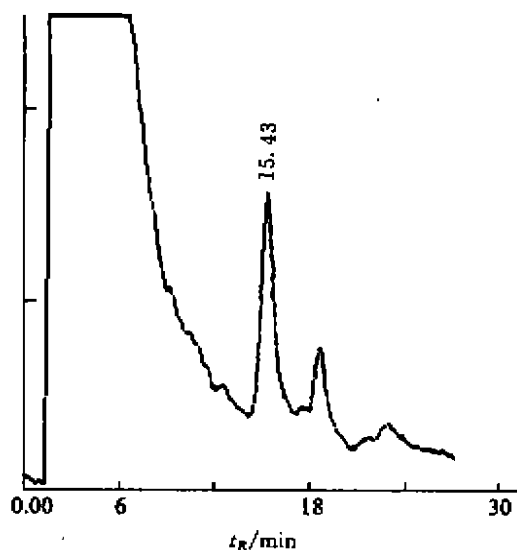


图 3 紫杉醇标准品 HPLC 图谱

Fig. 3 Chromatogram of HPLC of the Taxol

图 4 QT₁₂菌株 HPLC 图谱Fig. 4 Chromatogram of HPLC of Endophytic Fungus QT₁₂

3 讨 论

利用内生真菌来合成紫杉醇是近年来才开展的紫杉醇资源研究的方法之一,尚处于研究的初级阶段。该项研究的两个关键性问题就是能合成紫杉醇的内生真菌的分离和培养物中紫杉醇产量的提高。目前这方面的研究还比较少,但是利用内生真菌生产紫杉醇有以下的优点:①真菌一般比生长速率高;②能在简单培养基上生长,易于获得大量培养物;③可在生物反应器中大规模培养,培养条件相对易于控制和掌握等。

本实验是对建立产紫杉醇内生真菌的初筛方法的初步研究,从分离测定的结果看,QT₁₂内生真菌合成紫杉醇的量很少,有待于利用现代微生物技术诱变育种及加入紫杉醇的前体物质等方法来提高其产量。

参 考 文 献

- 1 陈毓亨,程克棣. 近年来国外紫杉醇资源研究进展. 国外医学:药学分册,1994,21(1):36~39
- 2 甘烦远,郑光植. 红豆杉的细胞工程学研究进展. 国外医学:植物药分册,1994,9(4):156~159
- 3 邱德有,黄美娟,朱至清. 一株云南红豆杉内生真菌的分离. 真菌学报,1984,13(4):314~316
- 4 Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces* and reanal, an endophytic fungus of *pauciflorus* comments. Science, 1993,260:214~216

(编 辑 张银玲)

The Study of Isolating Endophytic Fungus Synthesizing Taxol from Plant

MA Tianyou DONG Zhaolin

(Department of Biology, Northwest University, Xi'an, 710069)

Abstract A strain of endophytic fungus was isolated from the *Taxus chinensis* in the Qinling mountains. It was cultured in the liquid potato medium. By means of the thin layer chromatography, TLC Scanner, the cultures was analyzed and determined. The result shows this strain of fungus can produce taxol. The content of taxol in the fungus which was determined by HPLC was about 14.2 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Keywords *Taxus chinensis*; endophytic fungus; Taxol; thin layer chromatography; HPLC